

Estudi de l'aplicació dels panels de marcadors moleculars en la identificació individual i el test de paternitat en cavalls

**Doble Grau en Veterinària i Ciència i
Producció Animal**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÀRIA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL**

**TREBALL FINAL DE GRAU EN CIÈNCIA I PRODUCCIÓ
ANIMAL**

Bruna Puig-Pey Orra

Tutoritzat per: Dra. Romi Pena Subirà

Co-tutoritzat a *MyADNlab* per: Judit Mateus Porta

Projecte realitzat a *MyADNlab*





ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	3
RESUM.....	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓ.....	7
1.1. Cens d'èquids	7
1.2. Classificació de la població d'èquids	9
1.3. Identificació individual	11
1.4. Test de parentesc	13
1.5. Eines moleculars disponibles actualment	16
1.5.1. Els marcadors moleculars.....	16
1.5.2. Característiques del panel de mirosatèl·lits de la ISAG.....	17
2. OBJECTIUS DEL TFG	20
3. MATERIAL I MÈTODES	21
3.1. Material animal	21
3.1.1. Èquids mostrejats.....	21
3.1.2. Composició del kit de presa de mostres	22
3.1.3. Procés de mostreig.....	22
3.1.4. Entrada de les mostres al laboratori <i>MyADNlab</i>	23
3.1.4.1. Traçabilitat	23
3.2. Extracció d'ADN.....	24
3.2.1. Laboratori <i>MyADNlab</i>	24
3.2.2. Criteris d'elecció de les mostres per processar.....	24
3.2.3. Processos d'extracció del material genètic	25
3.3. El panel de marcadors genètics.....	28
3.3.1. Síntesi del procediment de genotipat.....	28
3.3.2. Amplificació	29
3.3.2.1. Amplificació amb el kit Stocks Marks™ for Horses Equine Genotyping Kit	29
3.3.2.2. Amplificació amb el kit Equine Genotypes Panel 1.1 (Thermo Scientific)®	30
3.3.3. Electroforesi capil·lar.....	31
3.3.4. Lectura i interpretació dels resultats	33
3.4. ANÀLISI DE PARÀMETRES GENÈTICS	35
4. RESULTATS.....	37



4.1. Síntesi de les mostres obtingudes i processades	37
4.2. Principals incidències detectades.....	38
4.3. Comparació de resultats segons el tipus de mostra utilitzat	40
4.4. Descripció de la variabilitat genètica mostrejada	41
4.5. Aplicació en la identificació individual dels cavalls	44
4.6. Aplicació en el test de paternitats.....	45
4.7. Cas pràctic en transferència d'embrions.....	46
5. DISCUSSIÓ	48
6. CONCLUSIONS	52
7. REFERÈNCIES / BIBLIOGRAFIA	53
8. ANNEXES.....	57
8.1. Cens Europeu d'èquids.....	57
.....	57
8.2. Races mostrejades en aquest treball	58
8.2.1. Àrab	58
8.2.2. Anglo-Àrab.....	59
8.2.3. Appaloosa.....	60
8.2.4. Cavall de Sang Belga (BWP).....	61
8.2.5. Holandès de Sang Calenta, KWPN.....	61
8.2.6. Pura Raça Espanyola (PRE)	62
8.2.7. Trotador francès.....	63
8.2.8. Cavalls creuats.....	64
8.3. Resum de les mostres preses i analitzades	65
8.3.2. Mostres processades amb el Kit Equine Genotypes Panel 1.1	66
8.4. Excel Compatibilitat.....	68
8.4.1. Introducció de perfils STRs Equí	68
8.4.2. Full de relacions de parentesc.....	69



AGRAÏMENTS

Voldria agrair a la Judit Mateus la oportunitat que em va donar podent participar en el projecte d'aplicació dels panels de marcadors moleculars en cavalls al Laboratori *MyADNlab*. Sense el seu suport i paciència aquest treball no hagués estat possible. També agraeixo a la meva tutora Romi Pena la seva dedicació i suport infinits que han convertit l'elaboració d'aquest treball en una tasca més fàcil.

Finalment m'agradaria donar les gràcies a tots els propietaris dels èquids mostrejats en aquest treball. Gràcies per confiar amb mi i deixar-me prendre mostres dels seus cavalls, sense ells aquest estudi no hagués estat possible.

RESUM

L'aplicació dels panels de marcadors moleculars en el test de paternitat en cavalls és un mètode amb un gran potencial. En aquest treball es demostra que es tracta d'una eina d'identificació fiable que permet definir el perfil genètic d'un èquid amb una senzilla mostra de pèl, sang o hisop bucal i establir les seves relacions de parentesc amb els individus mostrejats. Actualment existeix la necessitat de recórrer a aquestes tècniques genètiques, per exemple com a requisit per la inclusió dels cavalls als llibres de raça. Prenent de referent el cens d'Espanya, segons dades oficials del MAPAMA 2018, un 50% dels cavalls de l'estat són de raça. Aquest fet implica que aquests èquids, a part d'estar identificats amb els sistemes que obliga la legislació, han d'obtenir un anàlisi de paternitat per poder entrar a formar part del llibre de la seva raça pertinent.

L'objectiu d'aquest Treball de Fi de Grau ha estat posar a punt el panel ISAG de marcadors genètics de cavall i analitzar-ne les seves aplicacions comercials. Aquest treball s'ha dut a terme en col·laboració amb el laboratori *MyADNlab*, ubicat a Lleida, interessat en incorporar aquest servei a la seva oferta de serveis genètics, ja que dels 21 laboratoris oficials per dur a terme tests de parentesc en cavall, cap es troba a Catalunya.

Amb aquest fi, s'han pres mostres pèl, sang i hisops bucals, d'una població de 50 cavalls de 9 races i 3 països diferents, de les que s'ha extret ADN i obtingut el perfil genètic en les instal·lacions del laboratori *MyADNlab*. L'eficàcia d'èxit dels perfils genètics va ser més alta en pèl i pitjor en sang. La principal incidència detectada en els perfils ha estat la pèrdua del marcador ABS2, en el 48% de les mostres. En el conjunt de cavalls analitzat s'ha comprovat que tots els marcadors estan segregant, amb una mitjana de 7 al·lels per marcadors i amb



rangs de freqüències al·lèliques entre 0,015 i 0,56. A més a més, els alts valors d'heterozigositat observada i esperada i d'informativitat (PIC) dels marcadors, així com la baixa probabilitat de no exclusió i no exclusió combinada, indiquen que el panel és capaç de captar la variabilitat genètica de la població.

Amb exemples concrets, s'ha demostrat que els perfils obtinguts dels èquids genotipats són efectius en identificar de manera inequívoca cada cavall i assignar correctament les paternitats conegudes. Com a conclusió, es pot afirmar que amb el grau de variabilitat genètica obtingut d'aquest grup de cavalls, pocs marcadors poden ser suficients per identificar inequívocament un cavall i assignar les seves relacions de parentesc.

RESUMEN

La aplicación de los panels de marcadores moleculares en el test de paternidad en caballos es un método con un gran potencial. En este trabajo se demuestra que se trata de una herramienta de identificación fiable que permite definir el perfil genético de un équido con una sencilla muestra de pelo, sangre o hisopo bucal y establecer sus relaciones de parentesco con los individuos muestreados. Actualmente existe la necesidad de recurrir a esas técnicas genéticas, por ejemplo como requisito para la inclusión de los caballos en los libros de raza. Tomando de referente el censo de España, según datos oficiales del MAPAMA 2018, un 50% de los caballos del estado son de raza. Este hecho implica que estos équidos, aparte de estar identificados con los sistemas que obliga la legislación, deben obtener un análisis de paternidad para poder entrar a formar parte del libro de su raza pertinente.

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado ha sido poner a punto el panel ISAG de marcadores genéticos de caballo y analizar sus aplicaciones comerciales. Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con el laboratorio *MyADNlab*, ubicado en Lleida, interesado en incorporar este servicio a su oferta de servicios genéticos, ya que de los 21 laboratorios oficiales para llevar a cabo los test de parentesco en caballo, ninguno se encuentra en Cataluña.

Con este fin, se han tomado muestras de pelo, sangre e hisopos bucales de una población de 50 caballos de 9 razas y de 3 países distintos, de los que se ha extraído ADN y obtenido el perfil genético en las instalaciones del laboratorio *MyADNlab*. La eficacia de éxito de los perfiles genéticos ha sido más alta en pelo y peor en sangre. La principal incidencia detectada en los perfiles ha sido la pérdida del marcador ABS2, en el 48% de las muestras. En el conjunto de los caballos analizado se ha comprobado que todos los marcadores están segregando, con una



media de 7 alelos por marcador y con rangos de frecuencias alélicas entre 0,015 y 0,56. Además, los altos valores de heterocigosidad observada y esperada y de informatividad (PIC) de los marcadores, así como la baja probabilidad de no exclusión y no exclusión combinada, indican que el panel es capaz de captar la variabilidad genética de la población.

Con ejemplos concretos, se ha demostrado que los perfiles obtenidos de los équidos genotipados son efectivos en identificar de forma inequívoca cada caballo y asignar correctamente las paternidades conocidas. Como conclusión, se puede afirmar que con el grado de variabilidad genética obtenido en este grupo de caballos, pocos marcadores pueden ser suficientes para identificar inequívocamente un caballo y asignar sus relaciones de parentesco.

ABSTRACT

The application of molecular panels in equine paternity tests is a method with a great potential. This Final Project shows the reliability of the panels as an identification tool, which allows defining the genetic profile of an equid from a simple sample of hair, blood or buccal swab and establishing its paternity relationships with other individuals. Currently, there is a need to call on these genetic techniques, for example as a requirement for the inclusion of horses in the breeding books. Taking the Spanish census as a reference, according to official data from MAPAMA 2018, 50% of the state's horses are purebred. This implies that these horses, in addition to being identified with the systems required by law, must obtain a paternity analysis in order to enter the relevant breeding book.

The objective of this Final Degree Project was to develop the ISAG panel of horse genetic markers and analyze its commercial applications. This work was carried out in collaboration with *MyADNlab* laboratory, located in Lleida, who were interested in adding this service into their genetic portfolio, as currently none of the 21 national official laboratories that carry out paternity tests in horses is placed in Catalonia.

For this purpose, hair, blood and buccal swabs were collected from a population of 50 horses representing 9 breeds, in 3 different countries. Isolated genomic DNA was used to obtain genetic profiles at the *MyADNlab* laboratory facilities. The success rate of valid genetic profiles was higher than expected in hair and worse in blood. The main incidence detected in the procedure was the loss of the ABS2 marker in 48% of the samples analysed. All markers segregated in the group of horses analysed, with an average of 7 alleles per marker and with



allelic frequency ranging from 0.015 to 0.56. Furthermore, the high values of observed and expected heterozygosity and informativeness (PIC) of the markers, as well as the low non-exclusion and combined non-exclusion probability, indicate that the panel is capable of capturing the genetic variability of the population.

Using specific examples, our data indicate that the genetic profiles of the ISAG panel are effective at unequivocally identifying each horse and correctly assigning known paternities. In conclusion, it can be stated that given the genetic variability in this group of horses, a small number of markers may be sufficient to unequivocally identify each horse and assign their paternity relationships.



1. INTRODUCCIÓ

El terme èquid (*Equidae*) defineix una família de mamífers de l'ordre dels perissodàctils. Aquests formen part un gènere conegut com a *Equus*, que inclou els cavalls, els ases i les zebres. Aquest treball es centrarà exclusivament en cavalls (*Equus ferus caballus*) i per tant quan es fa referència a èquids es farà referència exclusivament als cavalls. Aquests tenen una dotació cromosòmica de 64 cromosomes.

Els cavalls són uns éssers presents a nivell mundial i s'utilitzen per una gran varietat de fins. Des del treball al camp, fins l'esport o com a font de menjar. Aquesta versatilitat dificulta tenir un cens d'èquids complet. En aquesta secció s'han consultat diverses fonts de cens animals per oferir un visió de la situació actual dels èquids a nivell mundial, europeu i espanyol.

1.1. Cens d'èquids

Per obtenir una visió general del cens de cavalls a continuació s'analitzen les dades disponibles a FAOSTAT fins al moment actual (fins el 2019), amb l'última actualització amb data de 22 de desembre del 2020 (FAO, 2020). Es poden extreure les següents conclusions sobre el cens dels èquids a diferents nivells: mundial, continental, per països i europeu.

A **nivell mundial**, a l'any 2019 FAO comptabilitza un total de 59.041.725 cavalls. Si s'analitzen dades del 1994 es pot veure que la població d'èquids al món ha experimentat diverses fluctuacions, essent el moment amb més població l'any 2007 amb 59.799.759 cavalls, i el moment amb menys població l'any 2013 amb un total de 56.598.683 èquids. A més, es pot afirmar que des de l'any 2018 la tendència va a l'alça.

A **nivell continental**, si s'analitzen les dades més actuals (any 2019), es pot veure que el continent que té un major nombre de cavalls és Amèrica amb un 54% de la població equina. Seguidament es troba Àsia amb un 24,9% i en tercer lloc Europa amb un 11,1%. Àfrica es troba en quart lloc amb un 9,4 % i per últim hi ha Oceania amb un 0,7%. Si es considera la mitjana de cavalls produïts des de 1994 fins a 2019 es pot veure que el principal productor durant aquests anys segueix és Estats Units d'Amèrica, el segon Xina i el tercer Mèxic.

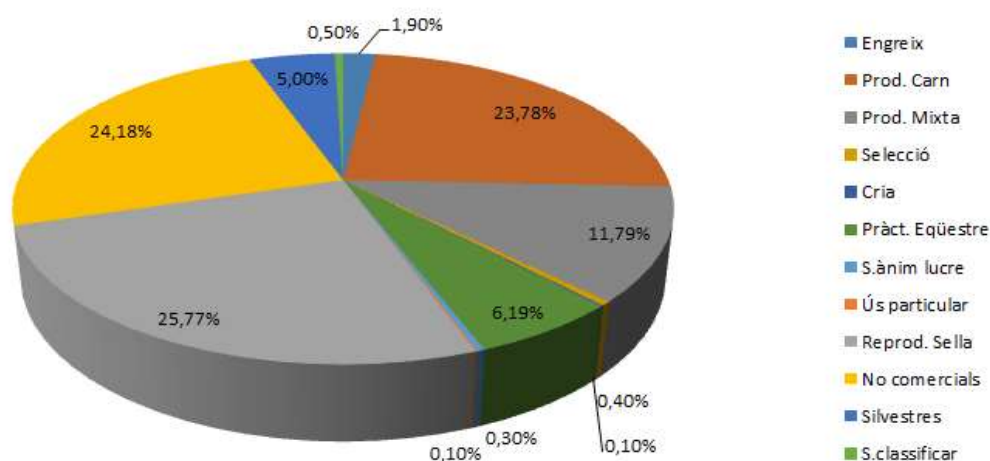
En el cas d'**Europa**, el nombre total de cavalls comptabilitzat a l'any 2019 per la FAO va ser de 4.696.333 èquids. Romania és el país amb un major nombre d'èquids, en segon lloc es situa Regne Unit i en tercer lloc Alemanya seguida de França. Espanya es troba en sisena posició en el rànquing Europeu.

A nivell **Espanyol** si es prenen per referent les dades més actuals del MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente) es pot veure que al 2018 el cens total a l'Estat Espanyol es situava en 632.355 èquids. La major part d'aquest cens es situa a Andalusia, amb un 33% de la població, seguit de Castella i Lleó amb un 11% del cens i ocupant el tercer lloc es troben dues comunitats autònomes, Galícia i Extremadura, amb aproximadament un 7% del cens. Catalunya es troba a la franja baixa amb un 5% de la població de cavalls de l'Estat Espanyol.

A nivell espanyol, fins l'any 2011, el sector d'èquids estava registrant un important augment, tant en nombre d'explotacions com del cens. La situació econòmica del moment afavoria aquest sector dins les activitats d'oci i turisme, a més la millora dels sistemes d'identificació i de registre disponibles van permetre una major quantificació dels efectius nacionals. Des del 2011, tot i que el nombre d'explotacions ha seguit incrementant de forma sostinguda, arribant a més de 188.000 explotacions a l'any 2018, el cens d'animals ha caigut significativament. Les comunitats autònomes amb major nombre d'explotacions a l'any 2018, coincideixen amb les que tenen major nombre de cens d'èquids (Andalusia, Castella i Lleó Galícia, i Extremadura).

Fins aquí cal matisar que no s'ha distingit entre els diferents interessos pels quals s'usa el cavall. S'ha comptabilitzat el total de la població equina independentment que s'usin els individus per la producció de carn, per l'oci o activitats esportives, entre d'altres. Per això cal distingir la distribució del cens segons la seva classificació zootècnica (*Il·lustració 1*). L'any 2018, a Espanya els cavalls reproductors per sella encapçalen el cens amb un 25,8 % respecte del total. En segon lloc es troben els cavalls no comercials amb un 24,2 % i seguidament els cavalls destinats a la producció de carn amb un 23,8%.

Distribució del cens del ramat d'èquids segons la classificació zootècnica, 2018





Il·lustració 1: Distribució del cens del ramat d'èquids a Espanya segons la classificació zootècnica, 2018 MAPAMA.

En el seu conjunt, el MAPAMA valora l'impacte econòmic del sector equí a Espanya en 5.303,6 milions d'euros (el que equival al 0,51% del PIB), i es calcula que és font de 61.247 llocs de treball a nivell nacional.

Finalment a nivell **Català**, segons les dades del MAPAMA 2018, es registra un total de 18.414 èquids censats. Aquests es distribueixen de la següent forma tenint en compte la seva classificació zootècnica: en primer lloc 9.289 que es destinen a la producció de carn, en segon lloc 2.974 que es dediquen a la reproducció per sella i en tercer lloc 1.849 que es destinen a la pràctica de l'equitació. Catalunya registra un total de 5.826 explotacions d'èquids.

1.2. Classificació de la població d'èquids

Per tal de definir les principals races de cavalls cal entendre què es considera per **raça**. En el marc espanyol, el RD 45/2019 de 8 de febrer, defineix el concepte d'animal de raça de la forma següent: tot animal que pertany a qualsevol raça d'interès ramader i productiu que està catalogada, inscrita o que pot inscriure's en un llibre genealògic gestionat per una associació oficialment reconeguda o per un servei oficial, amb la finalitat de poder participar en un programa de millora. Serà considerat animal de raça pura aquell que els seus pares i avis estiguin inscrits o registrats en el llibre genealògic de la mateixa raça.

El RD 45/2019 adapta i complementa els conceptes prèviament establerts pel el RD 2129/2008. Conceptes com l'establiment del *Programa Nacional de Conservació i Millora de Races Ramaderes*. Aquest programa defineix que -un llibre Genealògic és qualsevol llibre, fitxer, registre o sistema informàtic gestionat per una associació de ramaders reconeguda oficialment o en un servei oficial, en el que s'inscriuen o es registren animals d'una raça determinada, fent menció dels seus ascendents i constituint l'eina especial pel desenvolupament dels Programes de Millora-. El RD 2129/2008 també estableix el *Catàleg Oficial de Races de la Ramaderia d'Espanya*, que conté la relació oficial i la classificació de totes les races ramaderes reconegudes a Espanya a nivell nacional o internacional. Aquesta classificació es troba a l'annex I catàleg reconeix les races de cavalls següents:

- **Races autòctones:** raça espanyola.
- **Races en perill d'extinció:** Asturcò, Burguete, Cavall de Les Retortes, Cavall de la muntanya del País Basc, Cavall de Pura Raça Gallega, Cavall Mallorquí, Cavall Pirinenc Català, Hispano-Àrab, Hispano-Bretó, Jaca Navarra, Losina, Marismenya, Monxina i Pottoka.



- **Races integrades a Espanya:** Àrab, Anglo-Àrab, Pura Sang Anglès, Trotador Espanyol.
- **Races de la Unió Europea:** Cavall d'Esport Espanyol (C.D.E.).

Si s'analitzen les diferents races de cavalls que es poden trobar a Espanya es pot afirmar que la Pura Raça Espanyola esdevé la principal raça en aquest país, havent-hi registrats al 2017 239.813 exemplars, que signifiquen un 67% del total d'animals de raça censats a Espanya. (MAPAMA, 2018). A la *taula 1* s'il·lustren les principals races d'èquids censades a Espanya.

Taula 1: Principals races de cavalls censades a Espanya l'any 2017. Font: adaptat de (MAPAMA, 2018).

RAÇA	NOMBRE D'ANIMALS	% RESPECTE DEL TOTAL
Pura Raça Espanyol	239.813	67,45 %
Cavall d'Esport Espanyol	16.997	4,78 %
Àrab	16.234	4,57 %
Hispano-Bretó	12.578	3,54 %
Pura Sang Anglès	10.385	2,95 %
Hispano Àrab	9.357	2,63 %
Cavall Pirinenc Català	7.265	2,04 %
Anglo-Àrab	7.096	2 %
Altres races	35.824	10,04 %
TOTAL	355.549	100 %

Centrant-se en el marc de la Unió Europea, existeix la Directiva 2009/156/CE, que defineix els animals que s'integren dins de la família *equidae*: cavalls, burros, zebres i els seus creuaments. Aquesta directiva estableix 3 categories d'èquids diferents:

- **Èquids registrats:** Aquest grup integra tots aquells cavalls que estan registrats en llibres genealògics, establerts segons la regulació (EU) 2016/1012.
- **Èquids destinats al sacrifici:** Comprèn les races destinades a la producció de carn.
- **Èquids per la cria i la producció (poblacions creuades):** Integra tots aquells èquids no registrats en cap llibre de cria ni destinats a la producció de carn.

A nivell Mundial cal destacar la *WBFSH* (*World Breeding Federation for Sport Horses*) és una federació sense ànim de lucre que vetlla per protegir els llibres genealògics de les races existents als diferents països. Aquesta federació promou els interessos comuns de les associacions membres que gestionen llibres genealògics i actua com una organització que vetlla per la cria del cavall d'esport. Aquesta és el major connector entre les organitzacions de cria i els cavalls d'esport representats per la *FEI* (Federació Equestre Internacional). Actualment



hi ha 77 associacions membres que representen les diferents races que es consideren per l'esport de l'equitació (*World Breeding Federation for Sport Horses*, 2020).

1.3. Identificació individual

Tots els èquids presents a Catalunya han d'estar identificats d'acord amb el Reglament d'execució (UE) 2015/262 i el Reial Decret 676/2016 que defineix el següent:

El sistema d'identificació equina està constituït per:

- **Passaport o document d'identificació equina:** conté les dades bàsiques de l'animal (data de naixement, sexe, raça, color, aptitud per al consum humà...) i el nombre de xip de l'animal que és únic i l'identifica.
- **Transponedor injectable o microxip:** mètode de marcatge que garanteix un vincle entre l'animal i el seu passaport.
- **Universal Equine Life Number (UELN):** codi d'identificació individual de l'èquid, té 15 dígits, s'assigna individualment a cada èquid. És vàlid per a identificar-lo en qualsevol part del món.
- **Bases de dades:** informatitzades, contenen les dades dels animals identificats. Els èquids identificats a Catalunya s'enregistren al programa de gestió de traçabilitat ramadera (GTR – Gestió Telemàtica Ramadera), la qual està connectada amb la base de dades nacional d'explotacions (REGA – Registre d'Explotacions Ramaderes) i d'animals (RIIA – Registre d'identificació individual d'Animals). A part també es controlen els moviments dels èquids (REMO – Registre de mobilitat).

La normativa fa diferència entre **èquids registrats** (inscrits en un registre oficial gestionat per una organització de raça o una associació autoritzada per l'Estat membre), i els **èquids de cria i renda**, que són la resta; és a dir, els animals no inscrits en registres establerts oficialment, vulgarment coneguts com a cavalls creuats. Els èquids registrats són identificats per l'associació encarregada de la gestió i control del llibre genealògic de la raça. Per altra banda, els èquids de cria i renda són identificats per l'autoritat competent de la Comunitat Autònoma en què neixi el cavall, en el cas de Catalunya és el DARP (Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació). La identificació de l'èquid s'ha de fer en un període màxim de 12 mesos des del seu naixement. Si no és així, se li emetrà un passaport de tipus substitutiu i no serà apte pel consum humà.



Els èquids de menys de 12 mesos que es destinen a l'escorxador **directament** des de l'explotació de naixement no necessiten tenir passaport però si han d'anar microxipats i acompanyats d'una autorització emesa pel Departament.

Cal destacar que el sector dels èquids a Espanya està encara en fase de regulació i ordenació. Hi havia moltes explotacions no registrades i animals no censats que mica en mica es van identificant (Ministerio de Agricultura, 2019).

Al marc europeu la Directiva 2009/156/EC obliga als propietaris del cavalls, quan es vulgui realitzar un trasllat de l'èquid dins de la Unió Europea, a notificar-ho a les autoritats competents. A part d'haver d'expedir un certificat conforme el cavall està lliure de les malalties requerides, el propietari haurà de portar el document d'identificació (passaport equí). Aquest sistema d'identificació de l'èquid ha d'estar integrat pels següents elements:

- Un únic document d'identificació que inclou la descripció del cavall.
- Un mètode que relacioni el document d'identificació amb el cavall. S'accepta el transponder o mètodes com el perfil genètic o l'escàner de retina.
- Una base de dades on hi consti el número de passaport que és únic, amb els detalls del cavall i del propietari a la que se li va expedir la documentació.

Mètodes alternatius d'identificació:

Existeixen altres mètodes d'identificació alternatius, que es feien servir sobretot abans de l'aparició del microxip, el mètode actual vigent per la legislació. Aquests es basen en marques visuals que permeten identificar els cavalls de forma fàcil i garantir així una traçabilitat. També volen aportar el valor d'una marca d'origen dels cavalls, relacionant un símbol amb una explotació de cria d'èquids determinada. Els mètodes de marcatge més importants són (Matías, 2016) :

- **Marcatge amb foc:** es tracta del mètode més antic. S'aplica un ferro roent a la pell del cavall i la cicatriu que deixa en forma de lletres, números o símbols, identifica el criador del cavall.
- **Marcatge per congelació o criomarca:** Consisteix en aplicar a la pell del cavall un motlle de ferro amb la forma de la marca que es vol imprimir. El motlle s'introdueix prèviament en una mescla de neu carbònica (amb nitrogen líquid o diòxid de carboni diluït en acetona o alcohol). D'aquesta forma es destrueixen les cèl·lules pigmentaries



del pèl, i la cicatriu que creix té el pèl de color blanc. És per això que aquest mètode s'utilitza principalment en cavalls de capa fosca.

- **Marcatge per corrosió:** És similar als procediments anteriors, però el marcatge es duu a terme amb substàncies químiques. S'impregna el motlle de ferro amb substàncies corrosives que destrueixen les capes superficials de la pell i produeixen una cicatriu permanent. La cremada produïda no és gaire profunda, simplement es produeix la depilació.
- **Marques de color:** És un mètode transitori on es marca amb tinta o pintura alguna regió ben visible de l'animal. El seu objectiu és identificar els cavalls per algun procediment de maneig de curta durada (vacunacions, desparasitacions...).
- **Tatuat:** Consisteix en punxionar a la dermis o a les mucoses, petites partícules de color (animals, vegetals o minerals), dibuixant números, lletres i signes. Tot i que s'han perfeccionat les màquines de tatuar, aquest mètode ha entrat en desús. S'utilitzava sobretot per tatuar l'any de naixement del cavall mitjançant una lletra a la mucosa del llavi superior.

Actualment els sistemes mencionats anteriorment tenen menys importància i la identificació es duu a terme mitjançant sistemes electrònics (microxip). A més, el desenvolupament dels marcadors moleculars ha creat noves possibilitat en la identificació dels èquids. Aquests es definiran a l'apartat que ve a continuació (1.4. Test de parentesc).

1.4. Test de parentesc

El Real Decret 45/2019, posa com a requisit que els cavalls de pura raça han de ser identificats mitjançant marcadors genètics per poder incloure's al llibre genealògic de la raça que els correspon. La veracitat dels registres dels llibres genealògics és habitualment un dels punts més dèbils a l'hora de dur a terme un programa de millora genètica. Moltes vegades la seva informació no és correcta. És per això que és recomanable disposar d'un sistema que permeti certificar les relacions genealògiques per evitar que existeixin animals incorrectament filiats o de filiació desconeguda. També existeix la necessitat d'assegurar la correcta identificació dels animals al llarg de la vida, sobretot en animals de races d'alt valor econòmic, on el seu propietari pot canviar al llarg de la seva vida, com en el cas dels èquids (Bouzada *et al.*, 2008).

La *International Society of Animal Genetics* (ISAG) ha elegit un panel de marcadors microsatèl·lits per la identificació individual i les proves de paternitat en èquids, que es requereixen per la inscripció en els llibres genealògics de les diferents races. Aquests



marcadors proporciona una identificació inequívoca i permanent al llarg de la vida de l'animal (Santander *et al.*, 2011).

Per dur a terme els mètodes d'identificació moleculars, en primer lloc es prenen mostres biològiques de l'èquid que es vol identificar (sang, pèl,...). Aquestes s'amplifiquen amb la tècnica PCR (Reacció en Cadena de la Polimerasa), utilitzant cebadors específics per cada un dels 17 microsatèl·lits. Aquest sistema està estandarditzat internacionalment i s'utilitza en laboratoris de referència en genètica de cavalls (Santander *et al.*, 2011). Segons el MAPAMA l'any 2018 Espanya només disposava de 21 laboratoris que realitzaven filiació equina. A Catalunya no n'hi havia cap (MAPAMA, 2018).

El Real Decret 662/2007 designa un Laboratori Nacional de Referència d'identificació i control de la filiació animal. Aquest és el Laboratori Central de Veterinària del Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, situat a Algete. Aquest laboratori és el centre de referència per la realització dels marcadors genètics i l'homologació de les tècniques d'anàlisi per la identificació i el control de la filiació dels animals. El seu "*Departamento de identificación genética y gestión de recursos zoogenéticos*" té posat a punt panels de microsatèl·lits específics de diverses espècies ramaderes per garantir les genealogies inscrites en llibres genètics (Ministerio de Agricultura, 2007).

Taula 2: Comparació dels panels de marcadors microsatèl·lits utilitzats pel Laboratori Central de Veterinària del Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació pel seu ús en identificació genètica i gestió de recursos zoogenètics. Font: (Ministerio de Agricultura, 2020).

Microsatélites analizados en el Panel Primario

Equino	Bovino	Ovino	Caprino	Porcino
AHT4	BM1818	CD5	BM1818	Sw24
AHT5	BM1824	CSRD247	CSRD247	Sw240
ASB17	BM2113	ETH152	ETH152	Sw72
ASB2	CSRM60	HSC	HSC	Sw830
ASB23	ETH10	ILSTS005	ILSTS008	Sw857
CA425	ETH152	ILSTS011	ILSTS019	Sw911
HMS1	ETH225	ILSTS087	ILSTS030	Sw936
HMS2	ETH3	INRA005	ILSTS087	Sw951
HMS3	ILSTS006	INRA006	INRA005	S0002
HMS6	INRA005	INRA023	INRA006	S0005
HMS7	INRA023	INRA049	INRA023	S0070
HTG10	INRA063	INRA063	INRA063	S0090
HTG4	MGTG7	INRA172	INRA172	S0101
HTG6	SPS115	MAF65	MAF209	S0155
HTG7	TGLA122	McM42	MAF65	S0226
LEX3	TGLA126	McM527	McM527	S0227
LEX27	TGLA227	OarFCB20	OarFCB20	S0228
LEX33	TGLA48	SPS113	SRCRSP05	S0230
VHL20	TGLA53	SPS115	SRCRSP08	S0301
AME	TGLA57	AME	SRCRSP23	S0355
	AME		TGLA53	S0386
			AME	AME

A la *Taula 2* es mostra el panel de marcadors utilitzats per èquids, en comparació amb els d'altres espècies ramaderes. Es pot observar com tots els panels tenen marcadors específics, excepte oví i caprí, que per la seva proximitat filogenètica comparteixen 13 marcadors. El número de marcadors en els panels fluctua entre 19 i 21, segons l'espècie. El darrer marcador (AME) és un marcador de sexe (*Taula 2*). Els panels d'equí es comenten amb més detall a l'apartat 1.5. *Eines moleculars disponibles actualment*.



1.5. Eines moleculars disponibles actualment

1.5.1. Els marcadors moleculars

Els marcadors moleculars són punts variables entre els genomes de dos individus de la mateixa espècie. Tot i que n'hi ha diversos tipus, els dos grans grups de marcadors moleculars usats a nivell de recerca i a nivell comercial avui en dia són:

- **SNV** (de l'anglès *Single Nucleotide Variant*). Aquests són canvis puntuals en un nucleòtid concret del genoma i inclouen tant els SNPs (de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism*), que recullen totes les substitucions d'un nucleòtid per un altres, com els INDELs (de l'anglès *Insertion/Deletion*), ocasionats per la pèrdua o guany d'1-2 nucleòtids.
- Els **Microsatèl·lits**, també coneguts com *Simple Sequence Repeats* (SSR) o *Short Tandem Repeats* (STR), consisteixen en la variació en el número de repeticions en tàndem de seqüències curtes d'ADN (de 2-6 bp).

Aquest TFG es centra amb l'ús de microsatèl·lits per a proves de paternitat i identificació individual pel que s'explicaran amb més detall les seves característiques i principal aplicacions.

Els microsatèl·lits són seqüències curtes (normalment de 2 a 6 bp) repetides en tàndem, que no transcriuen i estan distribuïts aleatòriament per tot el genoma. Al tractar-se de seqüències nuclears (i no de seqüències mitocondrials), cada individu posseeix dues còpies de cada marcador, una d'origen patern i una altra d'origen matern, que poden ser iguals o diferents entre si. A més, per les seves reduïdes dimensions s'amplifiquen eficientment mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa, fins i tot des de mostres degradades, pel que també es fan servir de manera habitual en proves forenses. També tenen l'avantatge que es pot obtenir resultats a partir de mostres molt petites i molt fàcils d'extreure (optimitzades en la majoria de laboratoris que realitzen aquestes serveis per tal que no requereixin ni cap tractament químic ni refrigeració). D'altra banda, aquest sistema no genera indeterminacions perquè s'accedeix directament al genotip dels individus i, per tant, no es veu afectat per les relacions de dominància ni per les variacions de penetrància o expressivitat, com podria passar amb el color de la capa.

Els microsatèl·lits més abundants en el genoma equí i més utilitzats en els laboratoris són repeticions de seqüències (CA)_n. Els utilitzats com a eina en proves de paternitats i identificació individual són molt polimòrfics – tenen entre 5 i 22 variants cadascun – per la qual cosa és pràcticament impossible trobar dos individus iguals, servint d'identificació inequívoca.



Aquesta identificació és permanent al llarg de tota la vida de l'animal i independent del tipus de mostra biològica que s'utilitzi (sang, arrel capil·lar, saliva). La identificació per aquest mètode permet realitzar proves de paternitat, comparant els perfils genètics dels subjectes amb els dels seus progenitors. Aquest sistema és totalment fiable per l'exclusió de paternitat i per al càlcul de la probabilitat de paternitat positiva. El Real Decret 45/2019 indica que els cavalls de pura raça han de ser identificats mitjançant marcadors genètics. La Societat Internacional per la Genètica Animal (ISAG) ha triat un panel de marcadors microsatèl·lits per a la identificació individual i les proves de paternitat necessàries per a la inscripció en els llibres de registre.

A nivell més de recerca que de servei, els microsatèl·lits també s'han utilitzat àmpliament per investigar les relacions genètiques de les poblacions de cavalls (Solis *et al.*, 2005; Warmuth *et al.*, 2011), i poden proporcionar una molt bona indicació dels nivells de diversitat genètica inter- i intra-races,. En particular s'ha demostrat que, per als programes de conservació de races, els panels de microsatèl·lits proporcionen una millor resolució i especificitat per a les races de cavalls i, en la majoria dels casos, poden assignar correctament individus a les seves grups de races originals (Vilà *et al.*, 2001).

1.5.2. Característiques del panel de mirosatèl·lits de la ISAG

Durant la dècada dels 1990s es van identificar i provar un gran nombre de marcadors microsatèl·lits en cavalls. Diversos grups de recerca van proposar els seus propis panels de marcadors. S'entén com a panel un grup de marcadors moleculars que es prova sempre de manera conjunta sobre els animals. A principi dels anys 2000, el grup de treball d'estandardització dels test de paternitat en cavalls (**EGPTSC**, *Equine Genetics Parentage Testing Standard Committee*) de la **ISAG**, va proposar un nou panel per ser compartit per tots els laboratoris tant de recerca com els que ofereixen test de paternitat o d'identificació individual. Inicialment, l'EGPTSC va suggerir usar nou marcadors microsatèl·lits (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10 i VHL20) com a panel estàndard internacional mínim, així com marcadors addicionals (ASB17, ASB23, LEX33) fins arribar a un panel de 12 marcadors. Aquest grup de treball es troba cada dos anys en el congrés que organitza biennalment la ISAG. Abans de les reunions, la ISAG envia als laboratoris de referència internacionals ADN de varis cavalls per analitzar amb el panel de marcadors. A les reunions biennals es comprova la validesa dels resultats entre laboratoris, servint aquestes proves per optimitzar tant el panel com el procés de genotipat i d'assignació de paternitats. Per exemple, l'EGPTSC ha recomanat que l'exclusió de les proves de paternitat es basi en la incompatibilitat de dos o més



marcadors, perquè una exclusió basada en un únic marcador pot implicar un element d'incertesa.

Amb les darreres modificacions, actualment el panel de la ISAG consta d'un total de 17 marcadors microsatèl·lits (*Taula 3*). El cariotip dels cavalls consta de 31 autosomes i els cromosomes sexuals. Deu d'aquests marcadors es situen en cromosomes únics, dos d'ells es situen al cromosoma 4, dos més al cromosoma 9 i tres més al cromosoma 14. Cal destacar el marcador LEX-3 per situar-se en el cromosoma X i que per tant aportarà el doble d'informació en femelles que en mascles.

El mètode de genotipat es basa en l'amplificació dels microsatèl·lits mitjançant la tècnica de PCR (Reacció en Cadena de la Polimerasa), utilitzant encebadors (*primers*) específics per a cada un dels 17 microsatèl·lits (*Taula 3*). Aquests encebadors es marquen amb fluorocroms (per exemple, molècules de FAM, NED, VIC o PET) que permetran la seva detecció en sistemes de electroforesi capil·lar (seqüenciadors automàtics) tal com s'explicarà a l'apartat de *Material i Mètodes*. A la *Taula 3* també s'indica quin és el rang de mida que s'obté amb els encebadors per cada marcador. Per cada marcador, les diferents mides es deuen a diferents número de repeticions en tàndem del motiu de repetició indicat. La comparació de les mides entre animals permet fer-ne el genotipat.

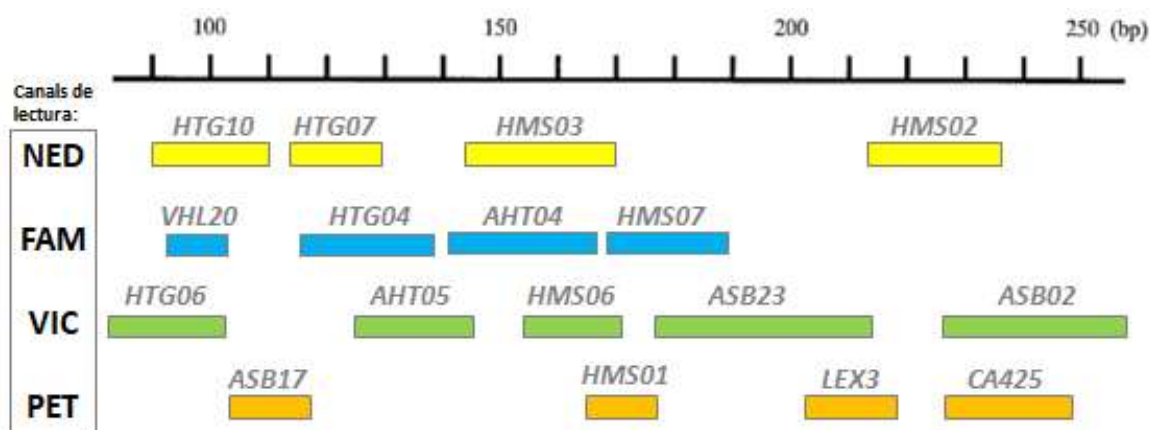
Taula 3: Característiques dels 17 microsatèl·lits equins dels panel ISAG. ECA – Cromosoma a *Equus caballus*. Font: adaptat de (Vázquez-Armijo *et al.*, 2017) i (Seyedabadi i Savar Sofla, 2017).

Loci	Cromosoma	Seqüències del Primer 5'-3'	Dye	Motiu de repetició	Rang de mida (bp)
AHT04	ECA24	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCT	6-Fam	(AC) _n AT(AC) _n	140 - 166
AHT05	ECA8	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGGGCTCAGC	VIC [®]	(GT) _n	126 - 147
ASB02	ECA15	F: CCTTCCGTAGTTTAAGCTTCTG R: CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	VIC [®]	(GT) _n	237 - 268
ASB17	ECA2	F: GAGGGCGGTACCTTTGTACC R: ACCAGTCAGGATCTCCACCG	PET [®]	(AC) _n	104 - 116
ASB23	ECA3	F: GAGGTTTGTAATTGGAATG R: GAGAAAGTCATTTTAAACCT	VIC [®]	(TG) _n	176 - 212
HMS01	ECA15	F: CATCACTTTCATGTCTGCTTGG R: TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	PET [®]	(TG) _n	166 - 178
HMS02	ECA10	F: ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG R: CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG	NED TM	(CA) _n	215 - 236
HMS03	ECA9	F: CCAACTCTTTGTACATAACAAGA R: CCATCCTCACTTTTCACTTTGTT	NED TM	(TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n	146 - 170
HMS06	ECA4	F: GAAGCTGCCAGTATTCAACATTG R: CTCCATCTTGTGAAGTGAACCTCA	VIC [®]	(TG) _n	154 - 170
HMS07	ECA1	F: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC R: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	6-FAM TM	(AC) ₂ (CA) _n	167 - 187
HTG04	ECA9	F: CTATCTCAGTCTTCATTGCAGGAC R: CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	6-FAM TM	(TG) _n	116 - 137
HTG06	ECA15	F: CCTGCTGGAGGCTGTGATAAGAT R: GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT	VIC [®]	(TG) _n	74 - 103



Loci	Cromosoma	Seqüències del Primer 5'-3'	Dye	Motiu de repetició	Rang de mida (bp)
HTG07	ECA4	F: CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R: ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	NED TM	(GT) _n	114 - 128
HTG10	ECA21	F: CAATTCCCGCCCCACCCCGGCA R: TTTTATTCTGATCTGTCACATT	NED TM	(TG) _n [C/T]	83 - 110
LEX3	ECA-X	F: TTTAATCAAAGGATTGAGTTG R: TTTCTCTTCAGGTGTCCTC	PET [®]	(TG) _n	203 - 217
UCDEQ42	ECA28	F: AGCTGCCTCGTTAATTCA R: CTCATGTCCGCTTGCTC	PET [®]	(GT) _n	224 - 247
VHL20	ECA30	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	6-FAM TM	(TG) _n	83 - 102

A la Il·lustració 2 es mostra un esquema de la distribució dels marcadors un cop realitzada l'electroforesi capil·lar. El seqüenciador permet llegir 5 canals de lectura, que corresponen als pics d'emissió de les fluorescències dels fluorocroms i que es solen indicar amb el color de longitud d'ona al que corresponen. Així FAM es llegeix al canal blau, NED al groc, VIC al verd i PET al vermell. El cinquè canal, el taronja, es fa servir per detectar el marcador intern de pes molecular (LIZ).



Il·lustració 2: Distribució dels 17 marcadors del panel de la ISAG pel test de parentesc en cavalls. Es mostren el rang de mides possibles per a cada marcador (rang dels al·lels). Els 17 marcadors poden ser analitzats simultàniament en una única carrera electroforètica en el seqüenciador ABI-3500. Font: pròpia.

Per tenir aquest panel disponible en un laboratori es pot fer de dues maneres:

- 1) Encarregant els encebadors marcats amb la fluorescència indicada a un proveïdor que sintetitzi encebadors.
- 2) Comprant la barreja d'encebadors directament a una de les cases comercials autoritzades per la ISAG (per exemple, *THERMO FISHER SCIENTIFIC* o *FINNZYMES*). L'avantatge de comprar-ho directament a les cases comercials és que els encebadors ja venen barrejats amb els reactius de la PCR optimitzats per aquesta finalitat. Aquest és el sistema que s'ha fet servir en aquest TFG.



2. OBJECTIUS DEL TFG

L'objectiu d'aquest Treball de Fi de Grau és posar a punt el panel ISAG de marcadors genètics de cavall i analitzar-ne les seves aplicacions comercials, tot col·laborant en la posada en marxa d'aquest servei amb el laboratori *MyADNlab*, ubicat a Lleida.

Amb aquest objectiu general d'implementar el mètode, es plantegen els següents objectius:

1. Comparar l'eficàcia de diferents matrius (pèl, sang, saliva) com a origen del material genètic.
2. Comparar la variabilitat genètica definida per aquests marcadors en diferents races.
3. Descriure la seva utilitat en la identificació individual dels animals.
4. Valorar la seva aplicació en la realització de tests de paternitat.



3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Material animal

3.1.1. Èquids mostrejats

Es van mostrejar 50 èquids, la selecció dels cavalls a mostrejar es va dur a terme valorant el seu interès per aquest treball (cavalls de raça o amb relacions de parentesc). Es van prendre mostres a cavalls de tres països diferents: Espanya, França i Bèlgica. Els cavalls formaven part de 6 poblacions diferents, entenent per població el centre eqüestre o de cria on els èquids resideixen. D'Espanya, es van seleccionar cavalls del centre de cria privat els *Rosers* (Juneda), d'un propietari privat (Artés) i del *Centre Eqüestre La Segona Màquina* (Juneda). De França, es van elegir cavalls del centre de cria privat *Can Tillet* (La Bastide) i de Bèlgica es van mostrejar cavalls del centre de transferència d'embrions *Keros* (Passendale) i del centre de cria privat *Ter Sculem* (Schulen).

El període de mostreig es va iniciar al desembre del 2019 i es va finalitzar a l'agost del 2020. Aquest va estar més llarg de l'esperat degut la interrupció que es va haver de fer del març al juny en que el laboratori va estar tancat per les restriccions imposades arran de la pandèmia de la COVID-19.

Dels 50 èquids mostrejats es va poder extreure el següent nombre de mostres:

- Hisops bucal: 47
- Extraccions de pèl de crinera i cua: 50
- Sang: 11

Es van extreure 47 mostres d'hisop bucal perquè del kit que es va enviar a Bèlgica es van extraviar 3 parells d'hisops per mostrejar, per això no es va poder arribar a 50. En el cas de la sang, es va decidir agafar menys mostres ja que, a diferència del pèl i dels hisops, l'extracció de sang ja es tracta una pràctica invasiva pel cavall perquè s'ha de realitzar una punció intravenosa. Es va creure inicialment que els propietaris no estarien conformes a permetre extreure aquesta mostra dels seus èquids. Tot i així va sorprendre que cap propietari als que se'ls va oferir prendre la mostra de sang als seus èquids va exposar cap inconvenient al respecte, per tant hi va haver més acceptació de l'esperada.



3.1.2. Composició del kit de presa de mostres

El kit amb el material de presa de mostres proporcionat per *MyADNlab*, estava constituït pel següent material:

- **Hisops bucal:** dues unitats d'hisops estèrils amb palet de fusta estèril de la marca *Deltalab*.
- **Paper absorbent:** una unitat de dimensions 10 x 6 cm, per dipositar-hi unes gotes de sang i recollir així la mostra de sang.
- **Bossa de plàstic amb tancament hermètic:** de dimensions de 17 x 10 cm. Una unitat per dipositar-hi la mostra de pèl i una unitat per emmagatzemar el paper absorbent de per la presa de sang.
- **Sobre de cartró:** una unitat de dimensions 17 x 12 cm. Per emmagatzemar l'hisop bucal, la bossa del plàstic que conté el pèl i la bossa de plàstic que conté el paper absorbent amb sang.
- **Imprès sol·licitud d'identificació equina:** document que el propietari ha de complimentar amb les seves dades i les de l'èquid mostrejat, per tal de fer efectiva la seva petició d'identificació genètica mitjançant 17 marcadors STR'S autosòmics.

Adicionalment l'autora d'aquest treball va comprar el material necessari per l'extracció de sang. Aquest és el següent:

- **Agulles:** 20 G X 1", 0,9 x25 mm, groga. De la marca *Kruuse*.
- **Xeringues:** 3 ml, de la marca *Kruuse*.

3.1.3. Procés de mostreig

El procés de presa de mostres es va realitzar exclusivament per l'autora d'aquest treball. Es va dur a terme de forma sistemàtica i estandaritzada seguint el protocol que es descriu a continuació:

1. **Presa de mostra de saliva:** s'ha agafat un hisop bucal estèril i es frega a la superfície mucosa oral del cavall. Es repeteix el procediment pel segon hisop. S'introdueixen els dos hisops dins del sobre de cartró.
2. **Presa de mostra de pèl:** s'arrenca un grapat d'uns 40 pèls de la crinera i la cua, és important que la mostra contingui l'arrel (*Il·lustració 3*). S'introdueix la mostra dins la bossa de plàstic i es tanca amb el sistema de tancament hermètic.
3. **Presa de sang:** es duu a terme una punció jugular mitjançant una agulla i xeringa, en la que s'agafa 1 ml de sang (*Il·lustració 3*). Es dipositen unes gotes de la sang presa a un

paper absorbent. Finalment s'introdueix el paper dins de la bossa de plàstic i es tanca amb el sistema de tancament hermètic.



Il·lustració 3: Esquerra: moment de presa de mostres de pèl a una euga receptora del centre *Keros*, Bèlgica. Dreta: moment de presa de sang d'una euga del Centre de Cria *Can Tillet*, França.

Finalment es proporciona al propietari l'Imprès sol·licitud d'identificació equina, perquè el complimenti amb la informació corresponent (dades del cavall, dades del propietari i firma).

3.1.4. Entrada de les mostres al laboratori *MyADNlab*

3.1.4.1. Traçabilitat

Per tal de garantir la traçabilitat de les mostres que ingressen al laboratori *MyADNlab*, aquest centre disposa d'un protocol de traçabilitat que identifica i ordena les mostres. Quan una mostra ingressa al laboratori s'introdueix en una base de dades tota la informació referent al propietari i al cavall (dades que es troben en l'imprès de sol·licitud que ha completat el propietari el dia de la presa de mostres). S'assigna un número a cada mostra seguint la següent distribució:

Exemple: 21 AID 005 M3

- Any: 2021 → 21
- AID: *animal identification*
- Número d'entrada de la mostra
- Tipus de mostra:
 - M1: hisop bucal
 - M2: pèl
 - M3: sang



3.2. Extracció d'ADN

3.2.1. Laboratori *MyADNlab*

El genotipat de les mostres es va dur a terme a les instal·lacions del laboratori *MyADNlab* al Parc Científic del turó de Gardeny, Lleida. Es va treballar sota la supervisió de la Judit Mateus, responsable del servei de genètica animal, que co-dirigeix aquest treball final de grau. El període de treball al laboratori es va iniciar al febrer del 2020 i es va finalitzar al desembre del 2020. Aquest va estar més llarg de l'esperat degut la interrupció que es va haver de fer del març al juny en que el laboratori va estar tancat per les restriccions imposades arrel de la pandèmia de la COVID-19.

MyADNlab és un laboratori de genètica i toxicologia forense especialitzat en proves d'ADN, de paternitat, maternitat i entre germans. En l'àmbit de genètica animal, el laboratori ofereix els serveis d'obtenir el perfil genètic caní i filiació canina. Aquest TFG recull la feina actual que s'ha fet per poder oferir en un futur el perfil genètic i filiació en èquids, ja que aquest servei no està disponible actualment a cap laboratori de Catalunya. Aquest objectiu és el que ha motivat aquest treball final de grau.

El laboratori compleix els requisits del certificat de qualitat *ISO 1725*, que atorga la competència tècnica en extracció dels hisops en humana i amplificació amb 16 i 23 STR. Aquest reconeixement implica una forma de treballar ordenada integrada per un sistema de traçabilitat de les mostres des de la seva entrada fins a l'elaboració de l'informe de resultats mitjançant codis i fulls de treball. Aquesta traçabilitat es manté durant els cinc anys que és el temps requerit per guardar les mostres analitzades. Per evitar la contaminació de les mostres es treballa de forma rigorosa. A més, entre altres mesures, es disposa el genotipat dels treballadors de l'empresa perquè si es treballa amb *primers* humans i es produeix un problema de contaminació, es sàpiga quin d'ells ha contaminat la mostra. En el nostre cas no existeix aquest risc ja que es treballa amb *primers* d'animals.

3.2.2. Criteris d'elecció de les mostres per processar

Les mostres que es volen processar han de complir uns mínims de qualitat i han de ser considerades com a vàlides. En cas contrari es descartarà el seu anàlisi, ja que és possible que els resultats obtinguts siguin erronis per la falta d'informació genètica. És per això que es van establir una sèrie de requisits per considerar si una mostra és vàlida o no. A continuació es detallen les causes per excloure una mostra del procés d'extracció del material genètic:



- **Mostra d'hisop bucal:** que contingui una quantitat considerable de menjar que ha ingerit el cavall anteriorment al mostreig. Si s'ha pres la mostra quan el cavall estava menjant i hi ha moltes fibres de farratge o pinso, la mostra es podria veure alterada. És difícil obtenir hisops bucals sense restes de menjar, però s'ha d'intentar obtenir les mostres amb les mínimes restes possibles. Una de les altres incidències detectades és no fregar suficient estona o amb suficient intensitat l'hisop a la boca del cavall, i que per tant no s'agafi suficient material genètic. És per això que cal contar uns segons de presa de mostra.
- **Mostra de pèl:** que els pèls seleccionats no continguin arrel. Es van haver de repetir les primeres mostres preses ja que no s'agafava suficient arrel, i per tant no hi havia suficient material genètic en la mostra presa.
- **Mostra de sang:** que hagi passat un període llarg de temps entre l'extracció de la mostra i el seu processat i per tant que hi hagin crescut fongs. Cal destacar que la sang es recollia amb un paper absorbent. Mètode econòmic i eficient que permetia treballar amb la sang presa amb poca antelació entre el mostreig i el processat. Es va donar el fet que per les restriccions imposades per la COVID-19 que van afectar el laboratori, es va estar uns mesos sense poder processar les mostres de sang i en algunes d'elles hi van créixer fongs. El mètode del paper absorbent és eficient si es treballen ràpid les mostres un cop extretes, si s'han de conservar un temps prolongat, s'hi desenvolupen alteracions pel fet de la forma de conservació a temperatura ambient i sense un medi de conserva.

3.2.3. Processos d'extracció del material genètic

El material genètic dels cavalls es va extreure a partir de tres matrius diferents (sang, pèls i hisop bucal). Sempre que va ser possible es van agafar els tres tipus de mostra de cada cavall. L'objectiu és poder comprovar no tant l'eficiència d'extracció d'ADN entre mostres, sinó l'eficàcia de cada matriu per donar un perfil genètic complet. Els mètodes d'extracció utilitzats tenen una part comú i una part específica de cada matriu que es detalla a continuació.

3.2.2.1. Preparació de les mostres

Extracció en mostres de sang

Es pren el paper absorbent on s'ha dipositat la gota de sang en la presa de mostres. Amb unes estisores es retalla una petita porció del paper que inclogui la part de la gota de sang i es diposita en un tub eppendorf. Si es troben parts florides, degut a la conservació prolongada de les mostres, es descarten les zones afectades i s'anota al full d'extracció que la mostra que



s'analitza tenia una part florida. L'extracció del material genètic es realitzarà amb aquesta porció seleccionada.

Extracció en mostres de pèl

Es seleccionen el màxim nombre de pèls amb arrel de la mostra i es retalla la porció d'arrel que es col·loca dins d'un tub eppendorf. Un cop seleccionada la mostra es podrà procedir a l'extracció del seu material genètic.

Extracció en mostres d'hisop

Es selecciona un dels dos hisops bucal que s'han utilitzat per la presa de mostres de l'animal. Es talla la part del cotó separant-la de la resta del pal de fusta i es col·loca dins d'un tub eppendorf. Seguidament ja es podrà procedir a l'extracció del seu material genètic.

3.2.2.2. Procés d'extracció

Un cop feta la selecció de les mostres de la forma que s'ha detallat anteriorment, en funció del tipus de matriu, es procedeix a dur a terme l'extracció del material genètic. Per fer-ho, s'utilitza el *Kit DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell®16* (Promega). No es fa dilució ja que la concentració d'ADN és baixa i les mostres es tracten com si fossin forenses. El material que integra el kit es detalla a continuació:

Material:

- Buffers:
 - Lisi
 - Elució
- DTD (dithiothreitol) 1M
- Proteïnasa K (10 mg/ml)

Abans de començar amb el procediment es prepara una mix d'extracció segons les quantitats que es mostren a la *taula 4*.

Taula 4: Preparació de la Mix d'extracció amb el kit *DNA IQ™ Casework*.

Proporció Mix d'extracció	
Reactius	Volum en µl / mostra
Buffer de lisis	350 µl
DDT	40 µl
Prot K	10 µl



Proporció Mix d'extracció	
Reactius	Volum en µl / mostra
Total	400 µl

Procediment:

1. Agafar els tubs eppendorfs preparats anteriorment amb les mostres que es volen analitzar i emplenar el full de treball d'extracció amb els codis de cada mostra i la informació addicional (número, data, categoria, tipus de mostra, observacions i firma de l'analista).
2. Afegir 400 µl de la Mix d'extracció dins del tub amb la mostra a analitzar.
3. Tapar el tub i barrejar-lo amb un vòrtex durant 5 segons.
4. Incubar durant 1 hora a 70°C a 1000 rpm.
5. Afegir 200 µl de buffer de lisis a cada mostra.
6. Centrifugar durant 10 segons.
7. Transferir el producte sobrenedant lisat en un nou tub eppendorf que es col·locarà a l'extractor automàtic *Maxwell* (Promega), com es pot veure a la *Il·lustració 4*.
8. Col·locar les gradetes i els *palangers* a la safata que de l'extractor automàtic.
9. Afegir 50 µl buffer d'elució en els tubs eppendorfs que contenen el material genètic.
10. Introduir la safata dins l'extractor automàtic *Maxwell* (Promega), que es mostra a la *Il·lustració 4*, i activar el programa.
11. En acabar, congelar les mostres obtingudes a -20°C si no es vol seguir amb el procediment d'amplificació al mateix moment. En cas contrari seguir el procés duent a terme el procediment de genotipat del material genètic, que es descriurà al pròxim apartat.



Il·lustració 4 Extractor *Maxwell* amb la safata preparada.

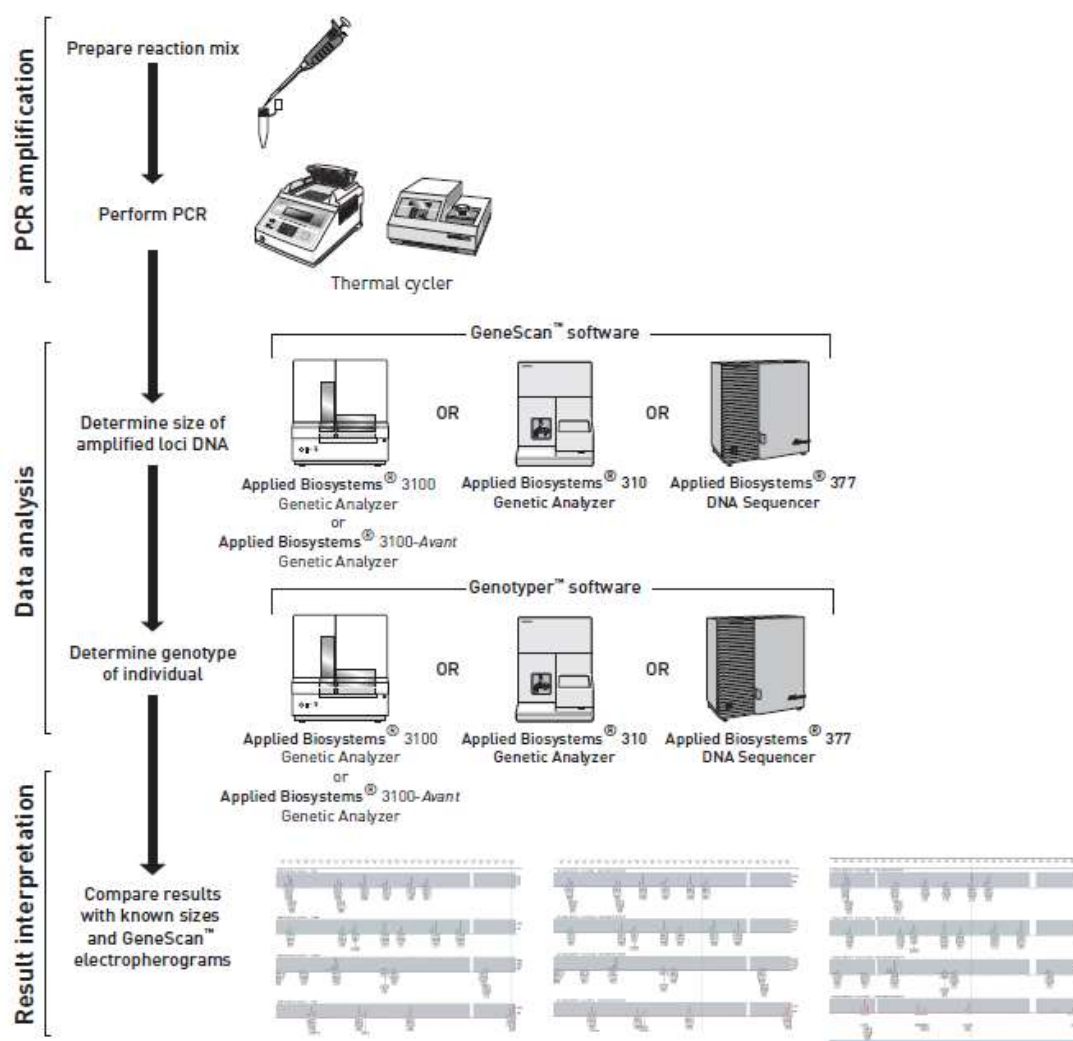
3.3. El panel de marcadors genètics

3.3.1. Síntesi del procediment de genotipat

Un cop extret el material genètic, el procés de genotipat de les mostres comporta tres passos representats en la *Il·lustració 5* que es descriuran detalladament als següents apartats. Aquests són:

- Pas 1 – Amplificació dels marcadors per PCR
- Pas 2 – Resolució del marcadors per electroforesi capillar
- Pas 3 – Lectura i interpretació dels resultats

Procedure overview



Il·lustració 5: Diagrama amb els passos necessaris durant el procediment de genotipat de mostres amb el kit StockMarks® for Horses Equine Genotyping Kit. Canal de lectura blau del seqüenciador. Font: Manual de l'usuari Thermo Scientific.



3.3.2. Amplificació

Inicialment es va començar l'ampliació del material genètic amb el Kit *StockMarks™ for Horses Equine Genotyping Kit* (Thermo Fisher Scientific), ja que era el kit del qual disposava el laboratori. Quan es va acabar aquest kit es va decidir comprar el Kit *Thermo Scientific Equine Genotypes Panel 1.1* (nova versió a Thermo Fisher Scientific).

3.3.2.1. Amplificació amb el kit *Stocks Marks™ for Horses Equine Genotyping Kit*

Material:

S'utilitza el kit *StockMarks™ for Horses Equine Genotyping Kit*. Aquest conté tots els reactius necessaris per amplificar un panel de 17 marcadors genètics tipus microsatèl·lits específics dels cavalls. Els reactius inclosos són:

- *Stock-Marks® PCR Buffer*
- *dNTP mix*
- *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase*
- *Amplification primer mix**
- *Deionized water*

*Cada kit permet analitzar 100 mostres.

Abans de començar amb el procediment es prepara una Mix d'amplificació segons les quantitats que es mostren a la *Taula 5*. Es fa dins d'una campana de bioseguretat de classe II i tipus A1, per evitar contaminacions amb productes amplificats de PCR.

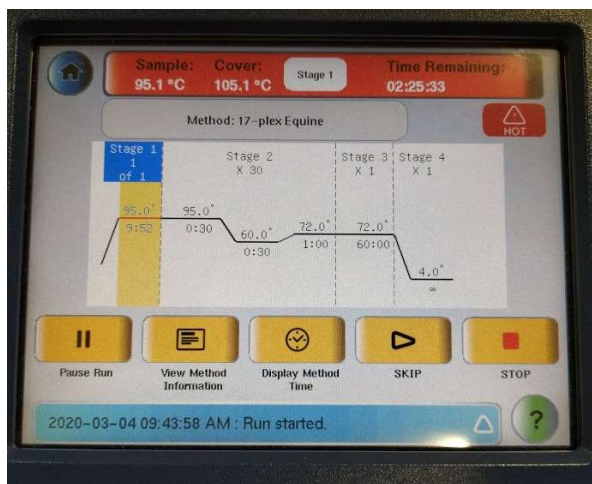
Taula 5: Preparació d'una Mix d'amplificació amb el kit *StockMarks*

Proporció de la Mix d'amplificació	
Reactius	Volum en µl / Mostra
Stock Marks® PCR Buffer	2,5 µl
dNTP mix (concentració no indicada al kit)	4,0 µl
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5U/ µl)	0,5 µl
Amplification primer mix	4,0 µl
Deionized water	3 µl
Total	14 µl

Procediment:

1. Es prepara la Mix d'amplificació prenent de referent les proporcions descrites en la taula anterior (*Taula 5*).
2. Es dispensen 14 µl de la Mix d'amplificació preparada anteriorment en microtubs per PCR i s'hi afegeix a cadascun 1 µl de la mostra obtinguda al procés d'extracció.
3. S'introdueixen les mostres preparades al termociclador. S'utilitza el termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)*. A l'il·lustració 6 (*dreta*) es veu com queden col·locades. Es selecciona el programa PCR: *17-plex Equine PCR (Il·lustració 6, esquerra)*.

* Temps de duració del programa del termociclador: 2:30 h.



Il·lustració 6: Dreta: Pantalla del termociclador amb el programa de PCR usat per amplificar el panel de microsatèl·lits. Esquerra: Aspecte intern del termociclador Veriti

3.3.2.2. Amplificació amb el kit Equine Genotypes Panel 1.1 (Thermo Scientific) ®

Material:

S'utilitza el kit *Equine Genotypes Panel 1.1* ®(Thermo Fisher Scientific). Aquest conté tots els reactius necessaris per amplificar un panel de 17 marcadors genètics tipus microsatèl·lits específics dels cavalls. Els reactius inclosos són:

- Primer mix
- Master mix*
- Control DNA001

*Cada kit permet analitzar 100 mostres.

Abans de començar amb el procediment es prepara una Mix d'amplificació segons les quantitats que es mostren a la *Taula 6*. Es fa dins d'una campana de bioseguretat de classe II i tipus A1, per evitar contaminacions amb productes amplificats de PCR.

Taula 6: Preparació d'una Mix d'amplificació amb el kit *Equine Genotypes Panel 1.1*

Proporció de la Mix d'amplificació	
Reactius	Volum en μl / Mostra
Primer mix	10 μl
Master mix	10 μl
Total:	20 μl

Procediment:

1. Es prepara la Mix d'amplificació (*Il·lustració 7*) prenent de referent les proporcions descrites en la *Taula 6*.
2. Es posa a cada microtub 20 μl de Mix d'amplificació.
3. S'introdueixen 2 μl de cada mostra d'ADN processada, en un microtub diferent.
4. A un dels microtubs es posen 2 μl de control DNA001 enlloc d'una mostra a analitzar.
5. S'introdueixen les mostres preparades al termociclador. S'utilitza el termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)*. A la *Il·lustració 6 (dreta)* es veu com queden col·locades. Es selecciona el programa PCR: *Equine Panel 1*.

* Temps de duració termociclador: 1:30 h.



Il·lustració 7: autora d'aquest treball preparant la Mix d'amplificació a les instal·lacions de MyADNlab, Lleida.

3.3.3. Electroforesi capil·lar

Un cop amplificats els marcadors moleculars del panel *StockMarks*, cal resoldre la mida dels fragments amplificats mitjançant una electroforesi capil·lar en un seqüenciador automàtic. Per cada marcador, la mida dels fragments correspon amb un al·lel o variant diferent. Per això es necessita preparar una Mix de desnaturalització amb el material següent:

Material:

- Hi-Di Formamide



- 500 LIZ Size Standard

Abans de començar amb el procediment es prepara una Mix de desnaturalització seguint les quantitats que es mostren a la *taula 7 i taula 8*, segons el tipus de kit utilitzat:

Taula 7: Preparació d'una mix de desnaturalització pel kit *StockMarks™ for Horses Equine Genotyping Kit*.

Proporció mescla de desnaturalització	
Reactius	Volum en µl
Hi-Di Formamide	20 µl
500 LIZ Size Standard	0,5 µl
Total	20,5 µl

Taula 8: Preparació d'una mix de desnaturalització pel kit *Equine Genotypes Panel 1.1*.

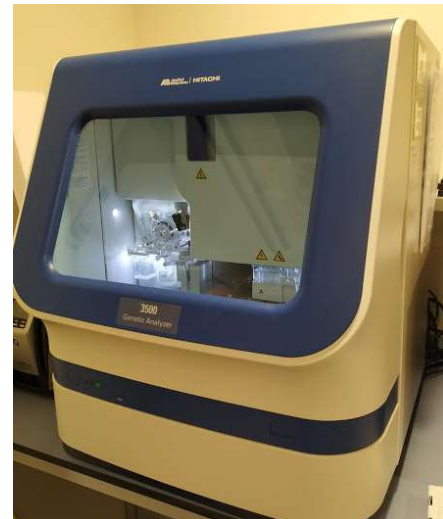
Proporció mescla de desnaturalització	
Reactius	Volum en µl
Hi-Di Formamide	11 µl
500 LIZ Size Standard	0,3 µl
Total	11,3 µl

Procediment:

1. Preparar en un tub eppendorf la mescla de desnaturalització amb les quantitats indicades segons el kit que es vulgui utilitzar (*taula 7 i taula 8*).
2. Barrejar el tub eppendorf amb un vòrtex durant 5 segons.
3. En una placa de 96 pouets, es posa 1,0 µl del producte de PCR i 20,5 / 11,3 µl de la mescla de desnaturalització. Es va omplint fila per fila, posant a cada pouet una mostra diferent.
4. Es posa un control (+) per cada columna, que es tracta d'una mostra d'ADN coneguda.
5. S'introdueix la placa al termociclador i es selecciona el programa de desnaturalitzar ADN (3 min. a 95 °C i refredament a 4 °C) (*Il·lustració 8*). Aquest pas permet obrir els productes de PCR en cadena senzilla.
6. Un cop finalitzada la desnaturalització, s'introdueix la placa al seqüenciador. S'ha utilitzat el seqüenciador 3500 (*Applied Biosystems*), de 8 capil·lars (*Il·lustracions 9 i 10*).



Il·lustració 9: Programa de desnaturalització al Termociclador Veriti.



Il·lustració 8: Seqüenciador ABI-3500, visió exterior.



Il·lustració 10: Seqüenciador ABI-3500 obert. En posició central es troba la placa de seqüenciació amb les mostres desnaturalitzades. Al fons es veuen els injectors dels 8 capil·lars que es faran servir per carregar les mostres als capil·lars (visibles dins del cercle negre) per resoldre els fragments per electroforesi.

3.3.4. Lectura i interpretació dels resultats

Un cop finalitzada l'electroforesi, es va utilitzar el programa *GeneMapper* (Applied Biosystems) per tal de llegir les variants al·lèliques de cada marcador i assignar el genotip de cada animal. En el cas dels cavalls, les diferents variants al·lèliques de cada marcador es designen amb lletres mentre que els resultats que ens proporciona el Kit *StockMarks™ for Horses Equine Genotyping Kit*, és en parells de bases (bp). Per tant, cal transcriure la mida dels al·lels (en



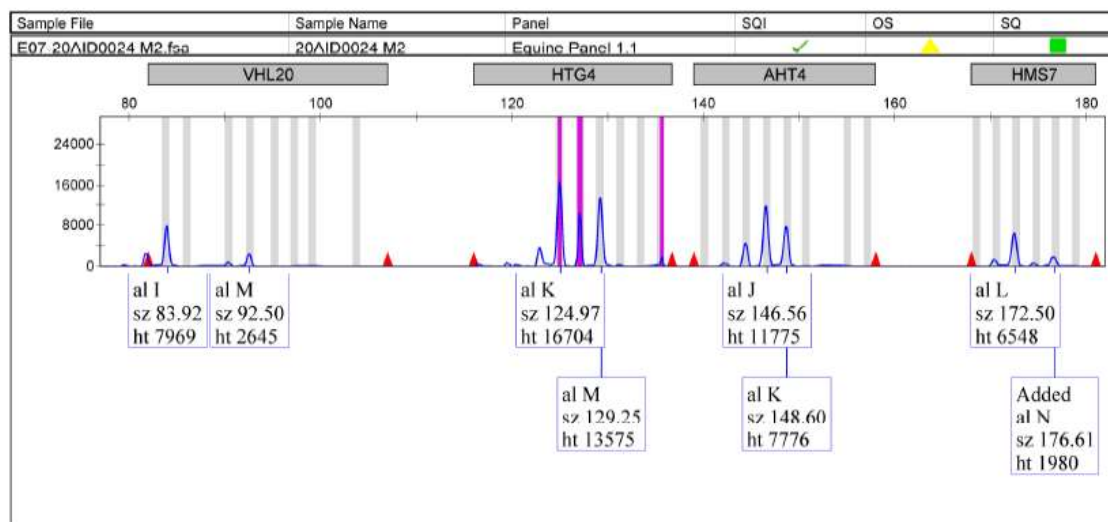
parell de bases) a lletres. Per fer-ho, es prenen com a referent els controls positius de cada placa, per verificar la posició de variants conegudes en la carrera electroforètica. A més, es comparen amb la taula d'equivalències dissenyada per la ISAG (*Taula 9*) per passar de mida d'al·lel a lletra. Actualment es poden trobar al mercat kits que ja et proporcionen els resultats en lletres directament. Aquest és el cas del segon kit utilitzat, el Kit *Thermo Scientific Equine Genotypes Panel 1.1*. Quan s'ha treballat amb aquest no ha calgut dur a terme aquest pas de transcripció.

Taula 9: Exemple de perfil complet de genotipat pels 17 marcadors del *Panel Stock-Mark* en un cavall, segons ISAG.

Marcadors equins dels al·lells de control positiu genotipats – Nomenclatura ISAG					
Resultats obtinguts amb el software Gene Mapper I correguts (running) amb el control positiu a 3500 xL amb POP4					
Marcador	Fluorocrom	Al·lel 1	Al·lel 2	Mida 1	Mida 2
VHL20	Blue	M	N	91.23	93.46
HTG4	Blue	K	L	124.58	126.65
AHT4	Blue	H	O	141.09	154.92
HMS7	Blue	L	Q	170.87	181.34
HTG6	Green	O		92.34	
AHT5	Green	J	O	126.74	138.05
HMS6	Green	K	P	153.61	164.32
ASB23	Green	K	S	187.86	204.47
ASB2	Green	R		250.85	
HTG10	Yellow	I	R	83.11	101.34
HTG7	Yellow	O		123.17	
HMS3	Yellow	M	P	153.61	160
HMS2	Yellow	K	L	219.68	221.58
Marcador	Fluorocrom	Al·lel 1	Al·lel 2	Mida 1	Mida 2
ASB17	Red	M	N	106.97	109.16
LEX3	Red	F	H	137.86	141.69
HMS1	Red	I		170.26	
CA425	Red	O		239.79	



En aquesta taula d'exemple, els valors obtinguts són per aproximació del pic màxim de l'al·lel a la recta patró del marcador de pes molecular intern 500 LIZ Size Standard. El resultat final obtingut de la sortida del seqüenciador es mostra en la *Il·lustració 11*. Els genotips complets per totes les mostres analitzades s'han integrat en la base de dades d'aquest TFG i es poden trobar a l'apartat *ANNEXES* al final d'aquest treball.



Il·lustració 11: Electroferograma obtingut de la carrera electroforètica de la mostra 20AID0024M2 en el seqüenciador ABI-3500.

3.4. ANÀLISI DE PARÀMETRES GENÈTICS

A partir del fitxer que inclou tots els genotips obtinguts (es pot trobar a l'apartat *ANNEXES* d'aquest treball), s'ha determinat la informativitat de cada marcador i del conjunt dels marcadors amb l'ajuda del programa *CERVUS*. Aquestes dades també han permès calcular la probabilitat individual i combinada de no exclusió individual i per proves de paternitats.

La capacitat del panel per identificar inequívocament cada cavall s'ha testat amb el programa *CERVUS*, comparant els perfils de tots els cavalls entre ells i permetent diferents números de marcadors incompatibles.

Les proves de paternitat s'han dut a terme mitjançant dues metodologies:

- D'una banda, s'ha utilitzat una plantilla interna de *Microsoft Excel* "Equins" configurada per l'equip del laboratori *MyADN lab*. Entrant els perfils obtinguts per la mare, fill i possibles pares a la plantilla es pot veure si hi ha una compatibilitat entre individus i per tant existeixen relacions filials. D'aquesta forma s'han estudiat els diferents casos de



parentesc dels individus mostrejats en aquest treball i s'ha analitzat un cas particular el de la euga receptora d'un embrió i els pares biològics de l'embrió que se li ha implantat.

- D'altra banda, amb el programa CERVUS s'ha fet un test de paternitat conjunt (els perfils de tots els fills, contra tots els possibles mares i pares) per comprovar que només es reconeixen les paternitats conegudes inicialment.



4. RESULTATS

4.1. Síntesi de les mostres obtingudes i processades

Mostres preses, processades i panels utilitzats

A la *taula 10* es detalla el nombre d'èquids mostrejats segons el tipus de mostra presa (hisop bucal, pèl i sang). Es pot veure que es van prendre 47 mostres d'hisop bucal, 50 mostres de pèl i 11 mostres de sang. De les mostres preses es van seleccionar part d'elles per genotipar. La selecció es va dur a terme segons els criteris definits anteriorment en l'apartat 3.2.2. Les mostres seleccionades pertanyen a 34 èquids diferents.

Es va treballar inicialment amb el kit *StockMarks™ for Horses Equine Genotyping Kit*. Amb aquest es van processar un total de 25 individus diferents no es van repetir mostres del mateix individu que no havien sortit correctament. Per això el número total d'èquids genotipats coincideix amb el nombre total de mostres genotipades. Al cap d'uns mesos de treballar amb el projecte es va poder comprar un kit més nou, el kit *Equine Genotypes Panel 1.1*. Amb aquest es van genotipar un total de 52 mostres, ja que es van repetir algunes mostres del mateix èquid que no havien sortit bé, per això no coincideix el nombre d'èquids genotipats (32) amb el nombre de mostres genotipades (52). En total es van processar amb aquest kit 32 èquids diferents.

Taula 10: Nombre de mostres preses, d'èquids genotipats i de mostres processades, segons el tipus de matriu (hisop bucal, pèl i sang) i el kit utilitzat (kit *StockMarks™ for Horses Equine Genotyping Kit*) i Kit *Equine Genotypes Panel 1.1*).

Tipus de mostra presa	Nº mostres extretes	Kit <i>StockMarks™ for Horses Equine Genotyping Kit</i>		Kit <i>Equine Genotypes Panel 1.1</i>	
		Nº èquids genotipats	Nº mostres genotipades	Nº èquids genotipats	Nº mostres genotipades
Hisop bucal (M1)	47	12	12	24	37
Pèl (M2)	50	4	4	3	3
Sang (M3)	11	9	9	5	12
Total	108	25	25	32	52
Total d'individus diferents mostrejats		Total de mostres preses (hisop, pèl i sang)		Total de mostres genotipades (suma dels dos kits)	
50		108		77	
				34	

Com a síntesi, es pot afirmar que dels 50 individus mostrejats i les 108 mostres de diferents tipus obtingudes (hisop, pèl i sang), es van processar 77 d'aquestes i es van aconseguir 34 perfils d'èquids diferents respecte el total de 50 que era el nombre d'èquids mostrejats. Dels



16 individus que no es va obtenir el perfil va ser perquè es van descartar les mostres per les causes que s'han descrit anteriorment en l'apartat 3.2.2.

Races d'èquids de les mostres preses

Si es consideren les races mostrejades en el treball, com s'il·lustra en la *taula 11*, es pot veure que la major part eren àrabs (15 individus), trotadors francesos (10 individus), Holandesos de Sang Calenta (9 individus) o Pura raça espanyola (7 individus). A més es van mostrejar també 6 cavalls creuats (no pertanyents a cap raça) i un individu de raça Appaloosa, un d'Anglo-Àrab i un de Westfalià. A la *taula 11* es descriu també la proporció de les races genotipades i de les mostres processades. Es van processar la totalitat de mostres dels individus d'Holandès de Sang Calenta (9 individus), de Pura Raça Espanyola (7 individus) i de creuats (6 individus). També 6 mostres d'individus de trotador francès i només 3 de raça Àrab. Es van genotipar també els tres individus de races diferents (Ànglo-Àrab, Appaloosa i Wesfalià).

Taula 11: Nombre d'animals mostrejats i de mostres finalment genotipades segons la seva raça.

Raça	Nº animals mostrejats	Nº animals de les mostres genotipades
Àrab	15	3
Ànglo-Àrab	1	1
Appaloosa	1	1
Pura Raça Espanyola	7	7
Trotador Francès	10	5
Holandès de Sang Calenta (KWPN)	9	9
Westfalià	1	1
Creuada	6	6
Total	50	34

Es va treballar amb només 3 mostres dels cavalls àrabs mostrejats, ja que aquestes van ser les primeres mostres que es van prendre i es va descartar la majoria de les mostres de pèl perquè s'havia agafat poca arrel i no s'havien fregat prou estona els hisops a les genives dels cavalls.

4.2. Principals incidències detectades

Només es va poder aconseguir un perfil complet, de 17 marcadors microsatèl·lits, de 3 de les mostres processades. A la *taula 12*, s'il·lustra el nombre de mostres que han perdut els diferents marcadors durant el processat dels resultats i per tant no es representen en el perfil de l'èquid obtingut. S'ha especificat per cada kit utilitzat i per cada marcador el nombre de mostres on no es va poder genotipar aquell marcador i el percentatge que representa la pèrdua respecte el total de mostres.



Analitzant els resultats es pot veure que el marcador que més s'ha perdut és l'ASB2. No s'han pogut mostrar els seus al·lels en el 48% de les mostres processades. Aquest percentatge coincideix en els dos kits utilitzats. Per tant aquest marcador s'ha perdut en quasi la meitat de les mostres processades pels dos kits. Analitzant de forma individual cada kit, es pot veure que amb el *Kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit* s'ha perdut en un 48 % també, el marcador HMS2. En tercer lloc el marcador HTG10 no s'ha pogut genotipar en un 36 % de les mostres. Per altra banda en el *Kit Equine Genotypes Panel 1.1*, ha fallat en segon lloc el marcador LEX3 (35 % de les mostres) i en tercer lloc el marcador VHL20 (31 % de les mostres).

Taula 12: Marcadors d'èquids (ISAG), total de mostres que no s'han pogut genotipar per cada marcador d'èquids de les mostres processades amb el *Kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit* i el *Kit Equine Genotypes Panel 1.1*.

Marcador	<i>Kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit</i>		<i>Kit Equine Genotypes Panel 1.1</i>	
	Total de mostres que no s'han pogut genotipar	Percentatge de mostres que han perdut els al·lels del marcador	Total de mostres que no s'han pogut genotipar	Percentatge de mostres que han perdut els al·lels del marcador
VHL20	6	24 %	16	31%
HTG4	5	20 %	5	10 %
AHT4	4	16 %	11	21%
HMS7	4	16 %	9	17%
HTG6	2	8 %	7	13 %
AHT5	2	8 %	6	12 %
HMS6	1	4 %	14	27 %
ASB23	5	20 %	12	23 %
ASB2	12	48 %	25	48 %
HTG10	9	36 %	8	15 %
HTG7	5	20 %	8	15 %
HMS3	4	16 %	11	21 %
HMS2	12	48 %	13	25 %
ASB17	4	16 %	11	21 %
LEX3	6	24 %	18	35 %
HMS1	6	24 %	14	27 %
CA425	3	12 %	9	17 %
Total de mostres genotipades	25		52	



4.3. Comparació de resultats segons el tipus de mostra utilitzat

S'ha treballat amb tres mostres diferents: hisop bucal, pèl i sang. Per veure la seva eficàcia, s'ha calculat el percentatge de mostres viables i no viables i dels marcadors moleculars amplificats segons el tipus de mostra. Per considerar un perfil viable es pren de referència el nombre de marcadors que s'han pogut seqüenciar. Si s'han perdut 7 o més marcadors dels 17 que integren el panel d'èquids reconegut per l'ISAG, el perfil obtingut no es considera viable. Els resultats es recullen a les *taules 13 i 14*, on s'han classificat les mostres segons el kit que s'ha utilitzat.

Com es recull en la *taula 13*, amb el *Kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit*, el tipus de matriu que ha donat un nombre més elevat de perfils viables és la del pèl, en que tots els perfils processats han estat reconeguts com a viables. Seguit de la matriu d'hisop on el 92% de perfils han estat viables i finalment la de sang en que el 89 % de les mostres processades han estat viables. Respecte el nombre de marcadors amplificats les mostres preses en hisop són les que han obtingut una mitjana superior de marcadors amplificats amb 14 de 17. Seguit de les mostres de pèl i de sang que ambdues han obtingut una mitjana de 12 marcadors amplificats.

Taula 13: Nombre de mostres analitzades, viables i no viables i els seus percentatges. *Kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit*

<i>Kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit</i>						
Matriu	Nº De mostres analitzades	Nº de mostres viables *	% de mostres viables	Nº de mostres no viables	% de mostres no viables	Mitjana de marcadors amplificats
Hisop bucal (M1)	12	11	92 %	1	8 %	14
Pèl (M2)	4	4	100 %	0	0 %	12
Sang (M3)	9	8	89 %	1	11 %	12
Total	25	23	92 %	2	8 %	12.9

Utilitzant el *Kit Equine Genotypes Panel 1.1 (taula 14)*, la matriu amb un nombre superior de mostres viables obtingudes ha estat el pèl, en que totes les mostres processades han estat considerades viables. En segon lloc es troba l'hisop bucal, amb un 78 % de mostres viables obtingudes. Finalment amb tercer lloc es troba la sang amb un 75 % de mostres viables obtingudes. Considerant la mitjana de marcadors amplificats es pot afirmar que el pèl ha estat la mostra amb la que s'han obtingut més marcadors amplificats amb una mitjana de 16. En segon lloc es troben empatats amb 12 marcadors amplificats les matrius d'hisop bucal i de sang.



Taula 14: Nombre de mostres analitzades, viables i no viables i els seus percentatges. *Kit Equine Genotypes Panel 1.1*.

Kit Equine Genotypes Panel 1.1						
Matriu	Nº De mostres analitzades	Nº de mostres viables *	% de mostres viables	Nº de mostres no viables	% de mostres no viables	Mitjana de marcadors amplificats
Hisop bucal (M1)	37	29	78 %	8	22 %	12
Pèl (M2)	3	3	100 %	0	0 %	16
Sang (M3)	12	9	75 %	1	25 %	12
Total	52	41	79 %	11	19 %	12.2

Com a síntesi general es pot afirmar que en tots dos kits s'aconsegueix genotipar un número similar de marcadors per mostra (12,9 en el primer kit vs 12,3 en el segon) tot i que el nombre de mostres viables és major en el primer kit (>90%). El tipus de mostra amb la que s'ha obtingut un major nombre de mostres viable ha estat en els dos kits el pèl. Aquest tipus de mostra ha donat una viabilitat del 100 % en els dos kits utilitzats, però cal destacar que s'han analitzat un nombre inferior de mostres de pèl que dels altres tipus, fet que pot influir amb els resultats i disminuir aquest alt percentatge de viabilitat obtingut. Respecte la mitjana de marcadors amplificats, en el cas de *Kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit*, el major nombre s'ha obtingut amb la matriu d'hisop en la que s'ha amplificat una mitjana de 14 marcadors. En canvi en el cas del *Kit Equine Genotypes Panel 1.1*, el tipus de mostra que ha donat una mitjana superior de marcadors amplificats ha estat el pèl amb una mitjana de 16.

4.4. Descripció de la variabilitat genètica mostrejada

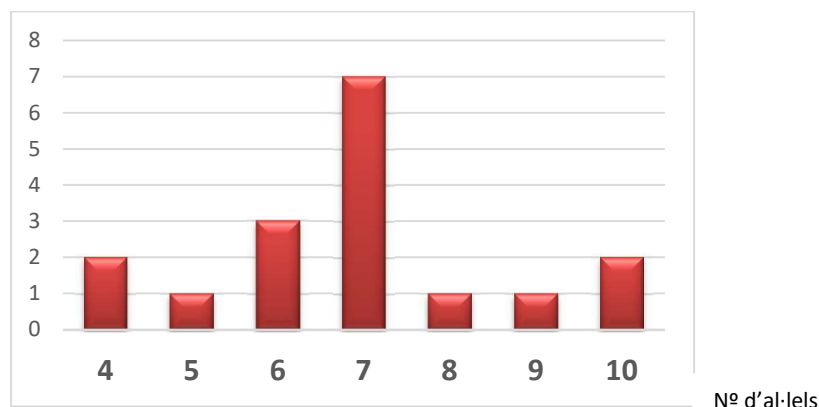
Així, es va obtenir un patró de microsatèl·lits de 34 cavalls diferents. Per cada animal, s'ha utilitzat per aquestes anàlisis els resultats més complets obtinguts de totes les mostres processades, que incloïen el 93% dels genotips esperables.

Primer de tot, s'ha vist que tots els microsatèl·lits analitzats eren polimòrfics en els cavalls genotipat (hi havia més d'un al·lel segregant). El nombre d'al·lells variava entre 4 i 10 (*taula 15*), sent la mitjana de 7 al·lells per marcador. Dos dels microsatèl·lits tenien només 4 al·lells mentre que en dos marcadors se'n van detectar fins a 10 (*Il·lustració 12*). Els al·lells designats com a B, C, D, T, V, Y no van ser detectats en cap dels cavalls analitzats ni per cap dels marcadors estudiats. La freqüència gènica mínima i màxima dels al·lells de cada marcador es mostren a la *taula 15*. Com es pot veure, el rang de freqüències obtingudes és molt ampli, entre 0.015 la més petita i 0.56 la més gran.

Taula 15: Descripció del número d'al·lels detectats per cada marcador en els 34 cavalls analitzats i el rang de freqüències gèniques.

Marcador	Nº al·lels	Al·lels	Freq mínima	Freq màxima
VHL20	9	I, J, L, M, N, O, P, Q, R	0.02	0.30
HTG4	5	K, L, M, N, P	0.05	0.44
AHT4	7	H, I, J, K, L, O, P	0.02	0.36
HSM7	6	J, K, L, M, N, O	0.09	0.28
HTG6	6	G, I, J, M, O, Q	0.01	0.39
AHT5	7	I, J, K, M, N, O, P	0.01	0.37
HSM6	6	K, L, M, O, P, Q	0.02	0.35
ASB23	7	G, I, J, K, L, S, U	0.01	0.26
ASB2	7	K, M, N, O, P, Q, R	0.04	0.24
HTG10	9	I, K, L, M, N, O, P, R, S	0.02	0.23
HTG7	4	K, M, N, O	0.06	0.56
HMS3	7	I, M, N, O, P, Q, R	0.03	0.35
HMS2	7	H, K, L, M, O, P, R	0.03	0.27
ASB17	10	F, H, J, K, M, N, O, R, S	0.01	0.32
LEX3	10	F, H, I, J, K, L, M, N, O	0.03	0.23
HMS1	4	I, J, M, N	0.03	0.44
CA425	8	G, I, J, L, M, N, O, P	0.01	0.54

Nº de marcadors



Il·lustració 12: Distribució del microsatèl·lits del panels ISAG d'èquids segons el número d'al·lels detectats en els 34 cavalls analitzats.

El fitxer de dades també es va fer servir per calcular uns paràmetres genètics relacionats amb la informativitat dels marcadors (taula 16). D'una banda es va comparar el nivells d'heterozigotitat observats (H-obs) i esperats (H-exp). Aquest valors indiquen quants cavalls tenien, per cada marcador, els dos al·lels diferents (H-obs) i es compara respecte al que s'esperaria per les freqüències gèniques (Hexp). Es pot veure que en la majoria dels casos, els dos valors (H-obs i H-exp) són molt similars. Si H-obs fos més baixa de l'esperada es podria sospitar d'un problema de consanguinitat a la població, però com que els cavalls venen de



varies procedències i són de diverses races, es pot veure aquesta diversitat amb valors de H_{obs} alts.

D'altra banda, un altre valor molt interessant a tenir en compte es el PIC (de l'anglès *Polymorphic Information Content*). Aquest paràmetre, que pot variar entre 0 i 1, proporciona informació sobre la variabilitat al·lèlica del grup d'animals analitzat. PIC es calcula com $1 - \sum (P_i)^2$, on P_i és la proporció de mostres que porten cadascun dels al·lells d'aquell marcador. Per tant, valors de PIC altes indiquen que els al·lells estan repartits entre molts animals. Com es pot veure a la *taula 16*, els valors PIC dels marcadors estudiats eren elevats (mitjana de 0.72), pel que es pot concloure que donada la distribució dels al·lells en aquests cavalls, aquests marcadors són altament informatius de la variabilitat genètica d'aquest grup.

Taula 16: Paràmetres genètics dels 17 marcadors d'èquids analitzats en els 34 cavalls genotipats en aquest TFG

Marcador	Al·lells	Nº cavalls amb genotip	H_{obs}	H_{exp}	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-I
VHL20	9	33	0.727	0.846	0.815	0.493	0.323	0.046
HTG4	5	33	0.667	0.689	0.623	0.74	0.575	0.159
AHT4	7	33	0.485	0.741	0.684	0.682	0.509	0.119
HSM7	6	34	0.794	0.821	0.782	0.556	0.378	0.063
HTG6	6	35	0.657	0.696	0.623	0.747	0.587	0.161
AHT5	7	35	0.629	0.771	0.725	0.632	0.452	0.092
HSM6	6	33	0.758	0.768	0.718	0.644	0.466	0.098
ASB23	7	34	0.824	0.824	0.786	0.548	0.372	0.061
ASB2	7	23	0.522	0.848	0.807	0.514	0.341	0.052
HTG10	9	32	0.75	0.837	0.801	0.524	0.351	0.055
HTG7	4	35	0.429	0.616	0.553	0.803	0.644	0.209
HMS3	7	34	0.735	0.782	0.738	0.611	0.432	0.085
HMS2	7	30	0.7	0.834	0.796	0.532	0.357	0.056
ASB17	10	34	0.853	0.798	0.757	0.582	0.405	0.074
LEX3	10	30	0.567	0.886	0.858	0.411	0.257	0.029
HMS1	4	31	0.677	0.631	0.544	0.799	0.661	0.221
CA425	8	35	0.6	0.667	0.628	0.735	0.55	0.147

H-obs – Heterozigositat observada en cada marcador; **H-exp** – Heterozigositat esperada; **PIC** – contingut d'informació polimòrfica; **NE** – probabilitat de no exclusió d'un parental (NE-1P), del segon parental coneixent el primer (NE-2P) o dels dos parentals (NE-PP); **NE-I** – probabilitat de no exclusió d'un individu (identitat).

Per últim, per cada marcador es pot calcular la **probabilitat de no exclusió (NE)** dels parentals erronis d'un animal. És a dir, amb quina probabilitat la combinació d'al·lells de cada marcador confirmaria (no exclouria) un cavall escollit a l'atzar com a parental real. Quan més alta és la NE, menys capacitat es té d'excloure pares erronis. A la *taula 16* es mostren les probabilitats NE per excloure un sol parental (NE-1P), o un parental quan es coneix del cert l'altre (NE-2P). Com es pot veure, les probabilitat de NE són en general elevades quan es mira cada marcador



separadament. En canvi, la probabilitat de NE combinada, és a dir, analitzant els 17 marcadors a l'hora és molt més baixa (*taula 17*). Els valors de la *taula 17* ens indiquen que la probabilitat d'assignar un parental erroni són molt baixes. Cal recordar que aquest grup de cavalls és molt heterogeni (races diferents, països diferents, pocs estan emparentats). Probablement, si reféssim aquestes anàlisis només fent servir els perfils d'una sola raça de cavall i d'un sol país, les probabilitats de NE serien més elevades.

Taula 17: Probabilitats de no exclusió combinades (17 marcadors del panel) en els 34 cavalls genotipats en aquest TFG

Probabilitat de no exclusió combinada	Valor
No-exclusió d'un parental fals	0.00022789
No-exclusió d'un parental fals (sabent del cert el segon parental)	0.00000074
No-exclusió individual (identitat)	9.806E-19

Les probabilitats de no exclusió també es poden calcular per la identificació individual dels cavalls respecte a tota la població (en aquest cas, en el grup de 34 cavalls). Com es pot veure, en el cas del 34 cavalls analitzats en aquest TFG, les probabilitats d'equivocar-nos a l'identificar un cavall és molt baixa ($9,8 \times 10^{-19}$).

4.5. Aplicació en la identificació individual dels cavalls

Per tal d'analitzar l'aplicació dels perfils dels marcadors amb aquest panel en la identificació individual d'èquids, es va dur a terme un anàlisi d'identitat amb el programa CERVUS on es van comparar en parelles els perfils de tots els cavalls i es van contar el nombre de coincidències, que correspondria a cavalls que es poden confondre ja que els marcadors no ens permeten diferenciar-los. Primerament, es van fer servir tots els marcadors del perfil i per tant, per dir que dos cavalls eren idèntics, havien de coincidir en tots els marcadors analitzats. No va haver-hi cap coincidència en les 595 combinacions de cavalls analitzades, demostrant que el perfil obtingut es efectiu en identificar de manera inequívoca cada cavall.

Com que de molts cavalls no es va obtenir el perfil complet i es considerava mostres viables les que tenien com a mínim 10 marcadors genotipats (*taula 12.*), es va repetir l'anàlisi limitant les coincidències a només 10 marcadors. De nou, de les 595 combinacions de cavalls testades, cap va ser coincident. Es va repetir l'anàlisi cada cop amb un nombre menor de marcadors coincidents per dir que dos animals eren idèntics. Els primers errors en la identificació de cavalls es van donar quan només es tenia en compte les lectures de 3 marcadors, en la que dos cavalls tenien perfils coincidents.



Per tant, aquests resultats mostren com amb el grau de variabilitat genètica d'aquest grup de cavalls, pocs marcadors poden ser suficients per identificar inequívocament un cavall. Com s'ha dit en l'apartat anterior, la probabilitat de no-exclusió de la identificació individual és molt baixa en aquest grup de cavalls, és a dir, és molt improbable fer errors d'identificació.

4.6. Aplicació en el test de paternitats

Dels 34 cavalls amb perfil d'ADN, 14 tenien una relació de parentesc directe i una era mare receptora d'un embrió transferit (*taula 18*). Amb aquesta informació es va testar amb el programa CERVUS si la informació genètica era suficient per identificar cegament aquestes relacions.

Taula 18: Relació de parentesc en 15 dels cavalls analitzats en aquest TFG .

Fill	Mare	Pare	Euga receptora
19AID0121	X	19AID0133	x
20AID0005	20AID0004	x	x
20AID0015	20AID0014	x	x
20AID0017	20AID0016	x	x
20AID0018	20AID0017	20AID0019	x
20AID0021	20AID0020	20AID0022	20AID0035

En un primer anàlisi, es va identificar al programa les 6 cries i va deixar la resta de mascles i de femelles com a pares i mares potencials, respectivament, per a que el programa fes l'assignació. El programa va assignar correctament totes les mares i pares coneguts (ressaltats en verd a la *taula 19*. Les probabilitats de no-exclusió d'un parental equivocat obtingudes (és a dir, la probabilitat d'equivocar-se assignant els pares) eren baixes. El programa també va assignar altres parentals tot i que el nombre d'incompatibilitats en els marcadors augmentava. Les dues tríades que es tenien comprovades són les úniques que tenen menys de 3 marcadors incompatibles entre els parentals i els fills, criteri que s'aplica per assignar les paternitats. L'euga receptora 20AID0035 no va ser en cap cas assignada com a mare del poltre 20AID0021 (Veure també l'apartat 4.7).



Taula 19: Assignació cega de pares i mares als 6 poltres del grup de cavalls analitzats en aquest TFG

FILL	MARE Assignada	PARE Assignat	Marcadors					Probabilitat de no-exclusió	Confiança triada
			Fill	Mare	Pare	Comparats	No compatibles		
19AID0121	20AID0123	19AID0133	15	14	15	15	5	1.94E-04	
20AID0005	20AID0004	20AID0002	15	17	12	15	6	2.32E-06	
20AID0015	20AID0014	20AID0019	17	17	14	17	3	6.40E-08	*
20AID0017	20AID0016	20AID0025	11	17	17	11	3	4.95E-05	+
20AID0018	20AID0017	20AID0019	17	11	14	15	1	1.24E-07	*
20AID0021	20AID0020	20AID0022	17	15	17	17	0	3.90E-07	*

Seguidament es va repetir l'estudi però indicant les mare conegudes, per a que el programa només ens busqués el pare. En el cas del primer poltre, on es coneixia el pare (19AID0133) però no la mare, es va "enganyar" el programa dient-li que aquest animal era la mare, per tal que busqués un altre cavall compatible com a pare. El programa va assignar pares correctes en les dues triades que es tenien al grup, amb alta confiança (taula 20). A més, va proposar altres pares per la resta de poltres, que coincideixen amb el que havia assignat prèviament. Aquí les probabilitats de no-exclusió del pare equivocat són més baixes perquè ja tenim la informació de la mare (taula 20).

Taula 20: Assignació cega de pares als 6 poltres amb mare coneguda del grup de cavalls analitzats en aquest TFG.

FILL	MARE real	PARE assignat	Marcadors				Probabilitat de no-exclusió	Confiança triada
			Fill	Pare	Comparats	No compatibles		
19AID0121	19AID0133	20AID0123	15	14	13	2	4.01E-12	+
20AID0005	20AID0004	20AID0002	15	12	10	5	4.06E-14	
20AID0015	20AID0014	20AID0019	17	14	14	3	6.59E-11	
20AID0017	20AID0016	20AID0025	11	17	11	2	1.05E-08	
20AID0018	20AID0017	20AID0019	17	14	14	0	2.15E-13	*
20AID0021	20AID0020	20AID0022	17	17	17	0	2.55E-10	*

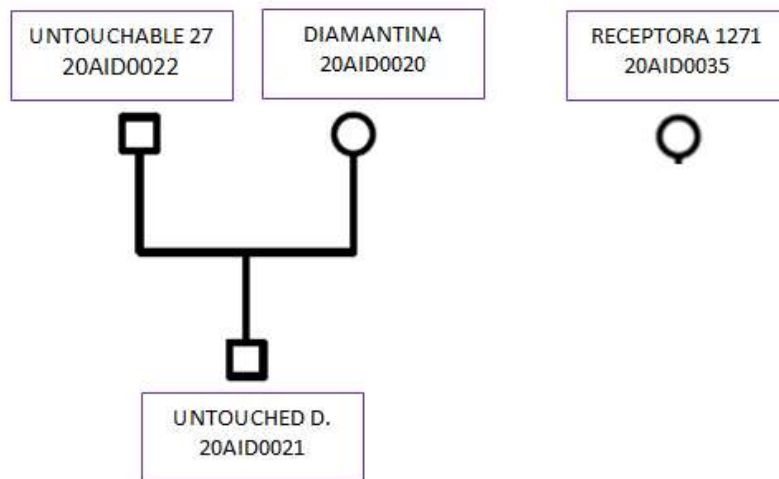
Aquests resultats confirmen que la variabilitat detectada amb aquest panel és suficient per assignar correctament paternitats, fins i tot quan no es tenen perfils complets de 17 marcadors.

4.7. Cas pràctic en transferència d'embrions

S'ha pogut demostrar la importància del test de paternitat en cavalls en un cas molt especial. Al centre de transferència d'embrions *Keros*, Bèlgica, es va poder mostrejar un poltre resultat de transferència d'embrions, l'*Untouched Diamond* (Il·lustració 14). Aquest és fill biològic, per

inseminació artificial, del famós semental *Untouchable 27* (Il·lustració 14). La seva mare biològica és una euga d'alt valor genètic, *Diamantina*. Per això es va optar a fer transferència de l'embrió de la *Diamantina* a una euga receptora del centre, sense cap valor econòmic, identificada amb el número 1271. Aquesta és la que va gestar i donar llum al poltre *Untouched Diamond*. Les relacions de parentesc d'aquest cas es representen en la Il·lustració 13.

Es van extreure mostres de tots aquests èquids, es van processar i un cop obtinguts els seus perfils, es van entrar a la plantilla de *Microsoft Excel "Equins"*. El resultat va ser que hi havia una coincidència del 50% del genotip del poltre *Untouched Diamond* amb el seu pare *Untouchable 27* i la seva mare *Diamantina*. En canvi la coincidència amb la seva mare receptora, que havia donat llum al poltre, era nul·la.



Il·lustració 13: Arbre genealògic èquids mostrejats a Keros (*Untouchable 27*, *Diamantina*, *Untouched Diamond* i *Receptora 1271*), amb els seus codis de referència assignats al laboratori.



Il·lustració 14: Esquerra: Untouched Diamond (polter) i 1271 (euga). Font: pròpia. Dreta: *Untouchable 27*. Font Keros.



5. DISCUSSIÓ

Per aconseguir el repte de posar a punt el panel ISAG de marcadors genètics de cavall al laboratori *MyADNlab*, s'ha treballat des del desembre de 2019. L'autora d'aquest treball ha pres mostres de 50 èquids de diferents races i països. A més ha participat en tota la part laboratorial d'extracció dels perfils genètics. Cal destacar que s'ha hagut de lluitar amb dificultats que suposava la implantació del mètode al laboratori, ja que es tractava d'una cosa nova pel centre i s'havien d'optimitzar tots els processos fins a obtenir un mètode per poder oferir aquest tipus de servei al client

Síntesi de les mostres obtingudes

Es van mostrejar 50 individus, obtenint una suma total de 108 mostres diferents entre hisops bucal, pèl i sang. Al final es va obtenir el genotip d'un total de 34 perfils d'èquids diferents respecte el total dels 50 individus mostrejats. Les races amb major nombre de perfils mostrejats i genotipats van ser: holandès de sang calenta (10 individus), espanyols (7 individus), (6 individus), trotador francès (6 individus). Dels cavalls àrabs es van descartar la majoria de mostres.

Dels 16 individus no genotipats es van descartar les seves mostres per complir amb els criteris d'exclusió de mostres de *l'apartat 3.2.2. Criteris d'elecció de les mostres per processar*. Bona part de les mostres descartades eren dels cavalls àrabs. Això s'explica perquè van ser les primeres mostres que es van prendre i no s'havia estandarditzat encara el protocol de mostreig. Els hisops bucal i el pèl no es van prendre correctament i per això es van haver d'excloure del procés de genotipat. Queda oberta la possibilitat de repetir les mostres i poder analitzar un major nombre d'individus d'aquesta raça.

Principals incidències detectades

Només es va poder aconseguir un perfil complet de 17 marcadors microsatèl·lits de 3 dels individus processats respecte els 34 totals. El marcador que més es va perdre és ASB2; no es van poder mostrar els seus al·lels en el 48% de les mostres processades mitjançant els dos kits.

Amb el Kit *StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit* el segon marcador que més es va perdre va ser HMS5 (48% de les mostres) i el tercer, HTG10 (36% de les mostres). En el cas del *Kit Equine Genotypes Panel 1.1*, el segon marcador que més es va perdre va ser LEX3 (amb un 35% de les mostres) i VHL20 (amb un 31% de les mostres).



Comparació de resultats segons el tipus de mostra utilitzat

Es va considerar que un perfil obtingut no era viable quan s'havien perdut 7 marcadors o més dels 17 que integren el panel d'èquids reconegut per l'ISAG. Amb el Kit *StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit* la matriu amb un nombre més elevat de perfils viables va ser el pèl, amb un 100 % de mostres viables (de les 4 analitzades). Però només es va obtenir una mitjana de 12 marcadors amplificats amb aquest tipus de mostra. El tipus de mostra amb un nombre més alt de marcadors amplificats va ser l'hisop bucal, obtenint un total de 14 marcadors.

En el cas del *Kit Equine Genotypes Panel 1.1* la matriu amb la qual es van obtenir un major nombre de mostres viables va ser el pèl, amb un 100% (de 3 mostres totals) i una mitja de 16 marcadors amplificats. Mentre que amb les mostres d'hisop i sang es va obtenir una mitjana del 75% de mostres viables i de 12 marcadors amplificats.

Es van analitzar un nombre inferior de mostres de pèl, respecte dels altres tipus, fet que pot influir amb el resultat del percentatge de mostres viables. Per obtenir conclusions més fermes es proposa analitzar el mateix nombre de mostres de cada tipus i un nombre superior d'aquestes. Els resultats obtinguts són específics pel mètode desenvolupat al laboratori *MyADNlab*. Cal tenir en compte que les mostres de pèl són les més barates ja que no es requereix material de presa de mostres ni tampoc l'experiència d'un veterinari com seria el cas de la sang.

S'han obtingut uns resultats pitjors dels esperats en sang. Aquest fet s'atribueix pel mètode de presa de mostres del paper absorbent. Si no es processaven ràpid les mostres preses i s'esperaven uns dies, podien créixer fongs i es podien deteriorar les mostres. Es proposa repetir la presa de mostres de sang mitjançant un tubs de col·lecció de sang. Aquest permet sistema juntament amb la conservació de les mostres en les condicions que es requereixin pel sistema del tub, garanteix la correcta conservació fins el dia del processat del material genètic.

Descripció de la variabilitat genètica mostrejada

El patró de microsatèl·lits obtingut va ser de 34 cavalls diferents. Tots els microsatèl·lits analitzats eren polimòrfics (hi havia més d'un al·lel segregant). El nombre d'al·lels variava entre 4 i 10, sent la mitjana de 7 al·lels per marcador. Els al·lels designats com a B, C, D, T, V i Y no van ser detectats en cap dels cavalls analitzats ni per cap dels marcadors estudiats.



El rang de freqüències dels al·lels obtingut va ser molt ampli, entre 0,015 i 0,56. A més els valors dels nivells d'heterozigositat observats i esperats van ser molt similars, per tant es descarten els problemes de consanguinitat de la població mostrejada. Aquest fet s'explica perquè els cavalls venen de diferents procedències i són de diferent races.

El contingut d'informació polimòrfica (PIC), proporciona informació sobre la variabilitat al·lèlica del grup d'animals analitzat. Els valors de PIC que es van obtenir dels marcadors genotipats van ser elevats (0,72), pel que es pot concloure que aquests marcadors són altament informatius de la variabilitat genètica d'aquest grup.

La probabilitat de no exclusió (NE) dels parenterals erronis d'un animal obtinguda, va ser molt baixa. Per tant es pot afirmar que la capacitat d'excloure els pares erronis és alta. Si es refés la presa de mostres i es fes servir perfils d'una sola raça de cavall i un sol país, les probabilitats de NE serien més elevades. Les probabilitats de no exclusió combinades que es van obtenir calculant NE per la identificació individual dels cavalls respecte a tota la població genotipada de cavall (34), també van ser molt baixes ($9,8 \times 10^{-19}$)

Aplicació en la identificació individual dels cavalls

En l'anàlisi d'identitat que es va dur a terme amb el programa CERVUS, es van obtenir resultats molt favorable. Primer es van comparar fent servir tots els marcadors analitzats. No hi va haver cap coincidència en les 595 combinacions de cavalls analitzades. Amb això es pot demostrar que el perfil obtingut és efectiu en identificar de manera inequívoca cada cavall. Aquest coincideix amb resultats obtinguts en estudis anteriors (Van De Goor, Van Haeringen i Lenstra, 2011).

Es va repetir la anàlisi cada cop per un nombre menor de marcadors coincidents per dir que dos animals eren idèntics. Els primers errors en la identificació de cavalls es van donar quan només es tenia en compte les lectures de 3 marcadors. En aquest cas dos cavalls van tenir perfils coincidents. Amb aquests resultats es pot afirmar que amb el grau de variabilitat genètica obtingut d'aquest grup de cavalls, pocs marcadors poden ser suficients per identificar inequívocament un cavall.

Aplicació en test de paternitats i cas pràctic de transferència d'embrions

Dels 34 cavalls amb perfil d'ADN, 14 tenien una relació de parentesc directe i una era mare receptora d'un embrió transferit. Amb aquesta informació es va testar amb el programa CERVUS si la informació genètica era suficient per identificar cegament aquestes relacions. El



programa va assignar correctament totes les mares i pares coneguts. Les probabilitats de no-exclusió d'un parental equivocament, és a dir d'equivocar-se assignant els pares, obtingudes van ser baixes. Aquests resultats confirmen que la variabilitat detectada amb aquest panel és suficient per assignar correctament paternitats, fins i tot quan no es tenen perfils complets de 17 marcadors.

A més s'ha pogut demostrar la importància del test de paternitat en cavalls en un cas molt especial, en el de la transferència d'embrions. En aquesta pràctica una mare receptora se li transfereix un embrió d'una euga donant. La receptora gestarà aquest embrió i donarà llum al poltre. Però tot i ser la seva "mare" no aportarà cap mena d'informació genètica al poltre (Allen i Wilsher, 2020). Si s'analitza el perfil genètic del poltre, es pot veure que és compatible amb el seu pare i la seva mare biològica i és incompatible amb el test de parentesc amb la mare receptora. Aplicant el mètode que es proposa del test de paternitat, l'euga receptora 20AID0035 no va ser en cap cas assignada com a mare del poltre 20AID0021.



6. CONCLUSIONS

1. S'ha complert l'objectiu d'aquest Treball de Fi de Grau, de posar a punt el panel ISAG de marcadors genètics de cavall i analitzar-ne les seves aplicacions comercials. El laboratori *MyADNlab* ha aconseguit implementar el test de paternitat en cavalls com a nou servei que ofereix la seva secció de genètica animal.
2. S'ha pogut comparar l'eficàcia dels diferents tipus de mostra (pèl, sang i saliva), obtenint un major percentatge d'èxit en pèl i uns resultats pitjors dels esperats en sang. En el cas de l'hisop bucal, els resultats han variat en funció del kit utilitzat i l'èxit ha estat intermedi entre pèl i sang. La principal incidència detectada ha estat la pèrdua del marcador ABS2, en el 48% de les mostres d'ambdós kits utilitzats.
3. Respecte la variabilitat genètica, el rang de freqüències dels al·lells obtingut ha estat molt ampli, entre 0,015 i 0,56. A més, els valors dels nivells d'heterozigositat observats i esperats han estat molt similars. Els valors de PIC que obtinguts són elevats (0,72), pel que es pot concloure que aquests marcadors són altament informatius de la variabilitat genètica d'aquest grup, el que resulta en probabilitats de no exclusió i no exclusió combinada molt baixes.
4. S'ha evidenciat la utilitat del mètode creat en la identificació individual dels èquids, demostrant que els perfils obtinguts són efectius en identificar de manera inequívoca cada cavall. El grau de variabilitat genètica obtingut d'aquest grup de cavalls, pocs marcadors poden ser suficients per identificar inequívocament un cavall.
5. Finalment s'ha demostrat que l'aplicació dels panells de marcadors moleculars en el test de paternitat en cavalls és un mètode amb molt potencial. Actualment existeix la necessitat de recórrer a aquestes tècniques genètiques, per exemple com a requisit per la inclusió dels cavalls als llibres de raça. En aquest treball es fa evident que es tracta d'una eina d'identificació fiable que permet definir el perfil genètic d'un èquid amb una senzilla mostra de pèl, sang o hisop bucal i establir les seves relacions de parentesc amb els individus mostrejats.



7. REFERÈNCIES / BIBLIOGRAFIA

- Allen, W. R. (Twink. i Wilsher, S. (2020) «Historical Aspects of Equine Embryo Transfer», *Journal of Equine Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 89, p. 102987. doi: 10.1016/j.jevs.2020.102987.
- ANCCE (2020) *El Caballo Español*. Disponible a: <https://www.ancce.es/contenido/el-caballo-espanol> (Accedit: 12 maig 2020).
- Anglo-Arabians Story* (2017). Disponible a: <https://anglo-arabians.com/about-anglos/> (Accedit: 11 maig 2020).
- Belgian Warmblood BWP* (2020). Disponible a: https://www.belgian-warmblood.com/EN/about_bwp (Accedit: 16 novembre 2020).
- Bouzada, J. A. *et al.* (2008) «Identificación genética y control genealógico en equinos mediante secuencias microsatélites de ADN», *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 104(2), p. 249-255. Disponible a: https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/43172/249-255_ITEA_104-2.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Delgado, J. F. *et al.* (2014) «Assessment of population structure depending on breeding objectives in Spanish Arabian horse by genealogical and molecular information», *Livestock Science*. Elsevier, 168, p. 9-16. doi: 10.1016/j.livsci.2014.07.012.
- Donoho, E. (2018) *What is a KWPN? H&H explains... - Horse & Hound*. Disponible a: <https://www.horseandhound.co.uk/features/everything-need-to-know-about-kwpn-670290> (Accedit: 26 novembre 2020).
- Edwards, E. H. (2016) *The Horse Encyclopedia*. 1a ed. Editat per DK. Disponible a: <https://books.google.es/books?id=IcDkDAAQBAJ&pg=PA158&dq=Belgian+warmblood+horse+BWP&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjvmduX64btAhXGasAKHU77D5EQ6AEwAXoECAUQAg#v=onepage&q&f=false> (Accedit: 16 novembre 2020).
- FAO (2020) *FAOSTAT. Production of Horses*. Disponible a: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize> (Accedit: 11 febrer 2021).
- Głazewska, I. (2010) «Speculations on the origin of the Arabian horse breed», *Livestock Science*, 129(1-3), p. 49-55. doi: 10.1016/j.livsci.2009.12.009.
- Van De Goor, L. H. P., Van Haeringen, W. A. i Lenstra, J. A. (2011) «Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis», *Animal Genetics*, 42(6), p. 627-633. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x.
- Lewis, B. D. (2007) «Appaloosa horse breed», *The Oregon Encyclopedia*, p. 2007. Disponible a: https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/43172/249-255_ITEA_104-2.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Lynghaug, F. (2009) *The Official Horse Breeds Standards Guide: The Complete Guide to the ...* - Google Libros. Disponible a: <https://books.google.es/books?id=myQBSVVEhagC&printsec=frontcover&dq=equine+breeds&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj48Kaw96PpAhUH4UKHcnnDFMQ6AEIKzAA#v=onepage&q=arabian+skeleton&f=false> (Accedit: 23 octubre 2020).
- MAPAMA, M. J. L. S. G. de P. G. (2018) «El Sector Equino en Cifras».
- Matías, R. G. (2016) «Identificación equina», *AECCPRE*, p. 49-55.

- MERAGEM, G. (2017) *PROGRAMA DE MEJORA DEL PURA RAZA ESPAÑOLA (ENERO 2017)*.
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2007) «Real Decreto 66/2007», *BOE*, 138. Disponible a: <https://www.boe.es/boe/dias/2007/06/09/pdfs/A25263-25268.pdf>.
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2019) «Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación», p. 22833. Disponible a: <http://publicacionesoficiales.boe.es/NIPO:003191624>.
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2020) *Departamento de identificación genética y gestión de recursos zoogenéticos*, 2020. Disponible a: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/lcv/identificacion_genetica.aspx (Accedit: 3 octubre 2020).
- Parker, R. (2013) *Equine Science*. DELMAR CENGAGE Learning. Disponible a: https://books.google.es/books?id=7bgKAAAAQBAJ&pg=PA54&lpg=PA54&dq=CHAPTER+3+Breeds,+Types,+and+Classes+of+Horses+T&source=bl&ots=eNNXk7vXd2&sig=ACfU3U2f05jevLXYHrDDieSj6sx_GVpbJw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi_2_bnirTpAhWB2-AKHZGMDksQ6AEwDXoECAgQAQ#v=onepage&q=C.
- Royal Dutch Sport Horse (2020) *Royal Dutch Sport Horse (KWPN)*. Disponible a: <https://www.kwpm.org/> (Accedit: 16 novembre 2020).
- Santander, P. *et al.* (2011) «Universidad Complutense de Madrid 1-», *Mössbauer Spectroscopy*, (April 2015), p. 1-16. doi: 10.1049/pbep001e_ch3.
- Seyedabadi, H. R. i Savar Sofla, S. (2017) «Türkmen at popülasyonunda soy tespiti amacıyla mikrosatellit analiz ve genetik karakterizasyon», *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(3), p. 467-471. doi: 10.9775/kvfd.2016.17096.
- Solis, A. *et al.* (2005) «Genetic diversity within and among four south European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: Implications for conservation», *Journal of Heredity*, 96(6), p. 670-678. doi: 10.1093/jhered/esi123.
- Swinney, N. J. i Langurish, B. (2009) *El caballo. Un Espíritu Libre*. 1st ed. Pattagon Books.
- Tissera Jorge, L. L. i Javier Aguilar, R. L. (2009) «Razas Equinas Guía De Trabajos Prácticos», p. 12.
- Le Trot (2020) *Le Trotteur Français*. Disponible a: <https://www.letrot.com/en/trotteur-francais/breed> (Accedit: 16 novembre 2020).
- Vázquez-Armijo, J. F. *et al.* (2017) «Diversity & effective population size of four horse breeds from microsatellite DNA markers in south-central Mexico», *Archives Animal Breeding*, 60(2), p. 137-143. doi: 10.5194/aab-60-137-2017.
- Vilà, C. *et al.* (2001) «Widespread origins of domestic horse lineages», *Science*, 291(5503), p. 474-477. doi: 10.1126/science.291.5503.474.
- Warmuth, V. *et al.* (2011) «European domestic horses originated in two holocene refugia», *PLoS ONE*, 6(3). doi: 10.1371/journal.pone.0018194.
- World Breeding Federation for Sport Horses (2020). Disponible a: <http://www.wbfs.org/GB/WBFSH.aspx> (Accedit: 13 febrer 2021).



Legislació consultada:

Real Decret-Ilei 45/2019, de 8 de febrer, per el que s'estableixen les normes zootècniques aplicables als animals reproductors de raça pura, porcins reproductors híbrids i el seu material reproductiu, s'actualitza el Programa Nacional de conservació, millora i foment de les races ramaderes o es modifiquen els Reals Decrets 558/2001, de 25 de maig; 1316/1992, del 30 d'octubre; 1438/1992, de 27 de novembre; i 1625/2011, de 14 de novembre. Boletín Oficial del Estado, 1 de març de 2019, núm. 52, pp.19716 a 19748. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2019/02/08/45>

Real Decret-Ilei 2129/2008, de 26 de desembre, pel que s'estableix el Programa nacional de conservació, millora i foment de les races ramaderes. Boletín Oficial del Estado, 27 de gener de 2009, núm. 23, pp. 9211 a 9242.

Directiva 2009/156/CE del Consell, de 30 de novembre de 2009, relativa a les condicions de policia sanitaria, que regulen els moviments dels èquids i les importacions d'èquids procedents de països tercers. DOUE, de 23 de juliol de 2010, núm 192 pp. 1 a 24.

Real Decret 676/2016, de 16 de desembre, pel que es regula el sistema d'identificació i registre dels animals de l'espècie equina. BOE, 16 de 17 de desembre de 2016, núm 304. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2016/12/16/676/con>

Real Decret 45/2019, de 8 de febrer, pel que s'estableixen les normes zootècniques aplicables als animals reproductors de raça pura, porcins reproductors híbrids i el seu material reproductiu, s'actualitza el Programa nacional de conservació, millora i foment de les races ramaderes i es modifiquen els Reals Decrets 558/2001, de 25 de maig; 1316/1992, de 30 d'octubre; 1438/1992, de 27 de novembre i 1625/2011, de 14 de novembre. BOE núm. 52, d'1 de març de 2019, pp. 19716 a 19748. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2019/02/08/45>

Real Decret 622/2007, de 25 de maig, sobre selecció i reproducció del ramat equí de races pures. BOE. Núm. 138, de 9 de juny de 2007, pp. 25263 a 25268. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2007/05/25/662>



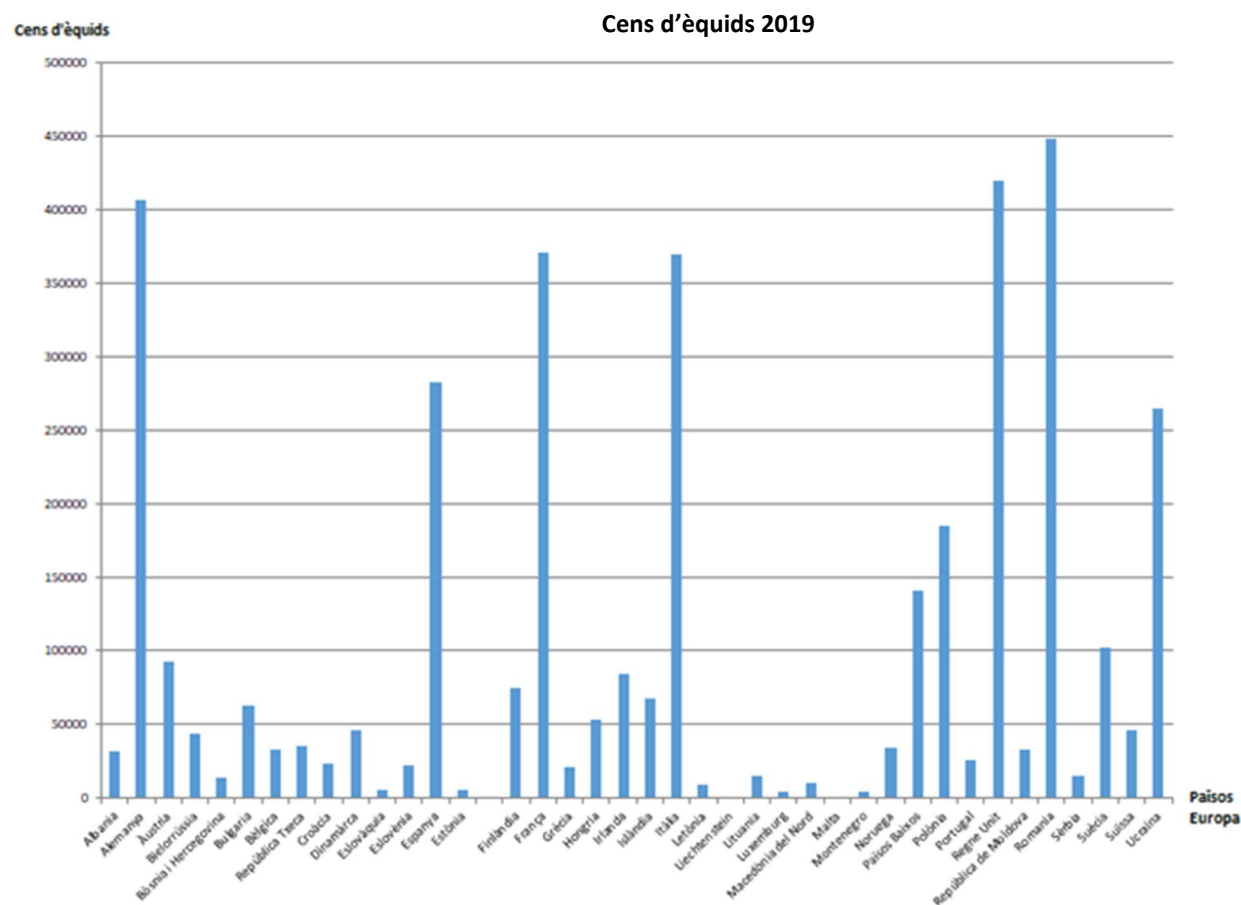
Fonts de les fotografies utilitzades:

- Poltre àrab: <https://www.deviantart.com/forset123/art/Chestnut-Arabian-Foal-91751244> (7/05/2020)
- Cavall àrab: <https://horse-canada.com/arabian/> (7/05/2020)
- Poltre anglo-àrab <https://www.horsebreedspictures.com/anglo-arabian.asp>
- Cavall anglo àrab <https://www.horsebreedspictures.com/anglo-arabian.asp>
- Poltre appaloosa: <https://www.horsebreedspictures.com/appaloosa-horse.asp>
- Cavall appaloosa: <https://casa-de-mascotas.com/caballos-appaloosa/>
- Mare i poltre belgues: <https://books.google.es/books?id=myQBSVVEhagC&pg=PA558&dq=Belgian+warm+blood+horse&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjG1eTX5YbtAhUoxIUkHT9kCjEQ6AEwAHoECAUQAg#v=onepage&q&f=false>
- Cavall belga saltant: <https://www.vdstud.com/images/gallery/73.jpg>
- Poltre espanyol: <https://www.yeguadaimoba.com/ejemplar/potro-pre-castano/>
- Cavall espanyol: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/equino-caballar/espanola/galeria.aspx#prettyPhoto\[pp_gal\]/4/](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/equino-caballar/espanola/galeria.aspx#prettyPhoto[pp_gal]/4/)
- KWPN poltre: <https://www.worldofshowjumping.com/en/News/Advertorials/Top-showjumping-genes-in-first-KWPN-Online-Foal-Auction.html>
- KWPN adult: https://www.google.com/search?q=KWPN+horse&rlz=1C1CHBF_caES816ES816&sxsrf=ALeKk00Va-Ttv89qp22IPeee2B9NtY7VRw:1606409794888&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiF9r_p1qDtAhWIAWMBHQB5CpUQ_AUoAXoECACQAw&biw=1366&bih=657#imgrc=q2m8_CW-UQfRM
- Trotador francès carro: <https://www.letrot.com/en/trotteur-francais/breed>
- Trotador francès muntat: <http://www.elevage-du-relais.com/fr/les-hommes/eleveurs.html>



8. ANNEXES

8.1. Cens Europeu d'èquids



Il·lustració 15: Cens de cavalls a Europa, any 2019, dades de FAOSTAT.



8.2. Races mostrejades en aquest treball

La població que s'ha mostrejat estava integrada per cavalls de les següents races:

8.2.1. Àrab

Es tracta d'una de les races més antigues del món (Głazewska, 2010). El seu lloc d'origen és el nord d'Àfrica, Península Aràbiga i Mesopotàmia Asiàtica. L'origen d'aquesta raça es remunta l'any 3000 a.C. i ha exercit una gran influència en les races d'èquids modernes. Les polítiques selectives de cria dels Beduïns van portar als cavalls àrabs que coneixem avui en dia. El cavall àrab va ser un instrument de guerra molt valorat pels Beduïns. Es van constituir cinc estírrps bàsiques de la raça, aquestes eren: kehilan, seglawi, abeyan, hamdani i hadban. Aquestes es poden diferenciar per lleugeres diferències morfològiques (com la profunditat del pit, l'alçada, els trets més esvelts o la complexió més atlètica...), però comparteixen els trets que integren la raça àrab (Swinney i Langurish, 2009).

Els colors més comuns d'aquestes famílies eren el tordo, el castany i el marró o bai. El negre no era un color de capa gaire freqüent ja que absorbeix més la radiació solar i això no ajudava als cavalls que vivien al desert. Per això els criadors van evitar el color d'aquesta capa mitjançant la selecció. Tot i així, avui en dia la majoria de cavalls àrabs ja no viuen al desert, pel que s'està intentant recuperar la capa negra i està adquirint molta popularitat. (Swinney & Langurish, 2009).

Quan els europeus varen descobrir el potencial d'aquesta raça la van començar a fer servir per millorar les races. D'aquesta manera el cavall àrab va dur a terme un paper transcendental en la creació de la raça pura-sang anglès, amb la selecció de tres sementals àrabs per realitzar els creuaments dels quals actualment provenen el 93% de pura-sang anglesos. (Swinney & Langurish, 2009). Però el cavall àrab també va tenir influència en moltes altres races com el poni de les muntanyes de Gales, el Haflinger austríac, l'Avelignese, entre molts altres. El paper de perfeccionament de moltes de les races actual dut a terme pel cavall àrab és únic transcendental per les races d'èquids (Delgado *et al.*, 2014).

Aquest èquid es caracteritza per tenir un cap petit de perfil còncau o sub-còncau, uns ulls grans i uns narius amplis. El seu coll és arquejat i el seu dors és curt. Té una figura molt esvelta i el seu pes és lleuger, arribant a pesar en l'edat adulta (*Il·lustració 17*) entre 350 – 450 kg. La seva alçada és entre 1,42 – 1,52 m, fet que es considera un cavall baix i d'estatura lleugera (Tissera Jorge i Javier Aguilar, 2009). Un de les diferències més destacables entre l'àrab i altres

racas es troba en el sistema músculo-esquelètic. Els cavalls àrabs tenen 17 costelles (les altres races en tenen 18), 5 vèrtebres lumbars (les altres races en tenen 6) i 16 vèrtebres caudals (les altres races en tenen 18) (Lynghaug F., 2009).



Il·lustració 17: Poltre àrab. Font: Deviant Art



Il·lustració 16: Cavall àrab. Font: Horse canada.

Si bé anteriorment era molt valorat per el seu ús bèl·lic, sent un vehicle de guerra molt preuat actualment és molt valorat en la pràctica de l'equitació. Destaca per la seva resistència i velocitat, per això és molt apreciat sobretot en la disciplina del raid. A nivell Espanyol, el cavall àrab és una de les poblacions de cavalls de pura raça importants. La raça àrab comptava amb una cens de 16.234 cavalls l'any 2018, essent la segona raça més abundant a Espanya juntament amb el cavall d'esport espanyol i per sota del cavall de raça espanyola (MAPAMA, 2018).

Des del 2005 l'associació Espanyola de Criadors de Cavalls Àrabs (AECCA) ha desenvolupat un programa de cria amb l'objectiu de millorar la conformació i els trets que es persegueixen per la pràctica de la disciplina del raid (Delgado *et al.*, 2014).

8.2.2. Anglo-Àrab

Es tracta d'una raça relativament nova originada a França. Tot apunta que els primers exemplars es van començar a produir a Normandia al voltant del 1750, però no està documentada la seva cria fins el segle XVIII. El seu llibre genealògic es va iniciar a França l'any 1833. La raça va començar a guanyar popularitat a finals del segle XIX en diverses disciplines, gràcies les seves característiques atlètiques. Ha contribuït en la formació de la raça sella francès i en varies races alemanyes (*Anglo-Arabians Story*, 2017).

La raça és fruit del creuament d'un cavall pura sang anglès amb un cavall àrab. Per considerar-se anglo-àrab el cavall ha de tenir mínim un 25% i màxim un 75% de sang d'àrab. Actualment es poden obtenir amb el creuament de dos èquids anglo-àrabs, sempre i quan es respectin els

percentatges mencionats anteriorment. Estan registrats al llibre de l'Associació de Cavalls Àrabs (AHA).

L'objectiu d'aquest creuament era combinar la resistència i la finesa de la raça àrab amb la velocitat i l'estatura del pura sang anglès. El resultat és un cavall d'una alçada de creu d'entre 1,54 i 1,65 m, tot i que la mida i la conformació variarà en funció del percentatge del creuament. La seva capa típica es castanya, grisa o marró (*Anglo-Arabians Story*, 2017).

És una raça molt valorada per la pràctica de l'esport eqüestre en varies disciplines, com per exemple el salt, la doma, el raid, entre d'altres. La població d'anglo-àrabs a Espanya registrava 7.096 cavalls a l'any 2018, representant només un 2% del cens de cavalls de pura raça registrats en aquest país (MAPAMA, 2018).



Il·lustració 18: Poltre anglo-àrab. Font: Horse Breeds Pictures.



Il·lustració 19: Cavall anglo-àrab. Font: Horse Breeds Pictures.

8.2.3. Appaloosa

Provenen de cavalls espanyols que es van portar a Sud Amèrica. Els creadors d'aquesta raça són una tribu d'Indis (Nez Perce). Es van seleccionar pel seu temperament, la seva resistència i la seva velocitat (Lewis, 2007).

Està caracteritzada pel seu pelatge blanc amb un puntejat marró negre per tot el cos. L'alçada de la seva creu és d'entre 1,40-1,50 m. Actualment es tracta d'una de les races Americanes més distingides i valorades (Lewis, 2007). És molt popular a Estats Units i a Austràlia (Parker, 2013). Es tracta d'una raça importada a Espanya, el nombre d'exemplars registrats en aquest país l'any 2018 no era significatiu comparat amb les altres races pures censades a Espanya (MAPAMA, 2018)



Il·lustració 20: Poltre appaloosa. Font: Horse Breeds Pictures.

Il·lustració 21: Cavall appaloosa. Font: Casa de Mascotas.



8.2.4. Cavall de Sang Belga (BWP)

La raça originària de Bèlgica, és relativament jove, ja que el seu llibre es va fundar l'any 1955. Aquest èquid va sorgir de la necessitat de crear un cavall de sella per les competicions eqüestres, perquè en aquell moment s'estaven utilitzant cavalls de treball per la pràctica de l'equitació. Al llarg de dècades es van anar seleccionant cavalls de la cavalleria belga i juntament amb cavalls de treball més lleugers, es van anar creuant amb èquids de pura sang, anglo-àrabs i altres cavalls europeus de sang calenta (*Hannoverià, Holsteiner, Sella Francès*). El resultat va ser la raça que és coneguda mundialment amb el nom de BWP, Cavall de Sang Belga (*Belgische Warmbloed Paard*) (Lynghaug, 2009).

Es tracta d'un cavall de talla gran amb una alçada de creu al voltant de 1,68 metres (*Il·lustració 22*). Té una constitució compacta i musculada, un coll curt i robust i unes extremitats fortes. Està dotat d'uns moviments potents i àgils que es combinen amb un caràcter tranquil i enfocat a l'exigència de la pràctica de l'esport que se li exigeixi (Edwards, 2016).



Il·lustració 22: Mare i poltre de Sang Belga. Font: Lynghaug, 2009.



Il·lustració 23: Cavall de Sang Belga, en la disciplina eqüestre de salt d'obstacles. Font: VDL Stud, 2020.

Tot i que aquest llibre de raça sigui el més petit dels llibres de raça en el món del cavall, els seus cavalls es troben en totes les disciplines i estan entre els millors resultats de les competicions eqüestres. El potencial d'aquesta raça destaca sobretot en la disciplina del salt (*Il·lustració 23*) (*Belgian Warmblood BWP*, 2020).

8.2.5. Holandès de Sang Calenta, KWPN

Es tracta d'una raça relativament moderna originada a Holanda, obtinguda a través del creuament de races Holandeses (*Gelderlander, Groningen...*) amb altres races com Pura Sangs o Sella Francesos. Després de la Segona Guerra Mundial l'ús de cavalls per treballs agrícoles va

disminuir i va augmentar l'interès en l'equitació. D'aquí en va sortir la necessitat de criar in cavall d'esport destinat a la pràctica eqüestre (Donoho, 2018).

L'objectiu de crear aquesta raça és aconseguir cavalls que s'utilitzin per l'esport eqüestre a nivell de competició de gran premi de doma o salt d'obstacles. Per això s'ha seleccionat la constitució i el caràcter. La majoria d'aquests cavalls es destinen a aquestes disciplines, però també hi ha un petit percentatge que es dedica a enganxar en carro. (Royal Dutch Sport Horse, 2020).

Es tracta d'un cavall de talla gran (figura x), amb una alçada de creu entre 1,6-17 m. Té una conformació musculada, amb una creu prominent i un terç posterior fort. La conformació i el caràcter varia en funció de si es tracta d'una línia dedicada a la doma o dedicada al salt d'obstacles (Donoho, 2018).



Il·lustració 25: polstre holandès de sang calenta, KWPN. Font: World of Show Jumping, 2020.



Il·lustració 24: cavall holandès de sang calenta, KWPN. Font: Royal Dutch Sport Horse, 2020.

8.2.6. Pura Raça Espanyola (PRE)

Es tracta d'una raça autòctona d'Espanya, sent la que té més pes a nivell d'aquest país. Representa el 67% del total del cens d'animals de raça pura amb 239.813 exemplars registrats a Espanya (MAPAMA, 2018). Els seus orígens es remunten a mitjans del S.XVI, quan el monarca Felip II va ordenar la població d'èquids del seu regne i va manar la construcció de les Cavallerisses Reials de Còrdova, lloc on es van reunir els millors sementals i eugues criades a la bora del Guadalquivir. Durant anys es va anar afinant la raça fins a obtenir un cavall considerat perfecte, que va esdevenir l'emblema de l'imperi espanyol. En un principi es va destinar per ús exclusiu a la Casa Reial (ANCCE., 2020),

Tot aquest procés va transcórrer en ple Renaixement, moment en què els espectacles eqüestres es van posar de moda i l'esport de l'equitació es va començar a popularitzar entre l'aristocràcia. Aquesta necessitat va portar a buscar una espècie que no existia, un cavall més esvelt, bonic i àgil, allunyant-se dels trets medievals que es volien per la lluita i com a

transport. Durant aquests cinc segles d'història aquesta raça ha passat per moments crítics, però s'ha lluitat per la perpetuació de la raça amb accions com la del rei Alfons XIII que va posar en marxa d'un registre pel Cavall Espanyol. L'any 1972 es va fundar la Associació de Criadors del Cavall de Pura Raça Espanyola (ANCCE) amb l'objectiu de vetllar per aquesta raça a nivell mundial (ANCCE, 2020).

Les seves característiques són: El cap té un perfil frontal sub-convex, amb un front ample. El seu coll és llarg i proporcionat, amb una crinera abundant. Té un pit ample i profund El tronc és robust amb un dors recte i curt, ample i musculat, una mica arquejat i lleugerament ascendent cap a la gropa. L'alçada de la creu oscil·la entre 1,50-1,72. Respecte el color del pelatge, són dominants les capes tordes i castanyes. No són característiques les taques blanques en excés a la cara, a les extremitats o a la resta del cos.



Il·lustració 27: Poltre Espanyol. Font: Yeguada Diomoba



Il·lustració 26: Cavall Espanyol. Font: Asociación Nacional de Criadores de Caballos de Pura Raza Española.

El seu interès principal és per la pràctica de l'esport equestre. Sobretot es valoren per la doma (clàssica, d'alta escola i vaquera). Però també s'utilitzen per altres activitats com el "rejoneo", "l'enganche", o el maneig del ramat o activitats del camp. A Espanya hi ha un Programa de Millora Genètica d'aquesta raça impulsat per la ANCEE i aprovat i supervisat pel MAPAMA. Aquest programa té com a objectius principals: obtenir animals sans que no posseeixin defectes hereditaris, millorar les característiques morfològiques de la raça d'acord el patró racial establert en cavall de PRE, millorar la conformació orientada a una morfologia destinada a la Doma Clàssica i el manteniment i millora de les característiques de comportament (MERAGEM, 2017).

8.2.7. Trotador francès

Raça originària de Normandia, nord de França. Sorgeix del creuament d'eugues natives de Normandia amb sementals Pura-Sang anglesos. Posteriorment amb creuaments amb cavalls

“American Standardbred” per incrementar la seva velocitat. El cavall que es coneix avui en dia com a trotador francès (*Trotteur Français*), va néixer al voltant del 1900 (Le Trot, 2020).

Es tracta d'un cavall de talla gran, *Il·lustració 29*, d'una alçada de la creu 168 cm. Els seus colors característics són castany, bai i marró. Destaca sobretot el gran desenvolupament de les seves extremitats posteriors, que el doten d'una velocitat i potència per les curses a les que es sol sotmetre els cavalls d'aquesta raça (Edwards, 2016).

Utilitzat per la disciplina de curses de trot tant amb un genet que el monti, *Il·lustració 29*, com enganxat en un carro, *Il·lustració 28*.



Il·lustració 29: Trotador Francès enganxat en un carro. Font: *Le Trot*.



Il·lustració 28: Trotador Francès muntat en una competició. Font: *Elevage d Relais*.

8.2.8. Cavalls creuats

Amb el mot “creuats” es fa referència als cavalls de raça indefinida. Aquests són cavalls no estan registrats a cap llibre genealògic per dues condicions:

1. Cavalls amb progenitors que pertanyen en races diferents, per tant la seva descendència no serà una raça pura i no es podrà incloure a cap llibre genealògic.
2. Pares de raça indefinida.

Segons el MAPAMA, el 51,8% dels cavalls censats a Espanya són animals creuats. Gran part d'ells es destina a la pràctica de l'equitació, participant en diverses disciplines (salt, doma,...).



8.3. Resum de les mostres preses i analitzades

8.3.1. Mostres processades amb el kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit

Taula 21: Mostres processades amb el kit StockMarks TM for Horses Equine Genotyping Kit. Data de processat, nom, codi, matriu, resultats, relacions filials, nºal·lells perduts, al·lells perduts.

Data de proce Kit	Nom	codi	Matriu	Resultats	Relacions filials	nº alels perduts	Al·lells perduts
19/12/2019 vell	Bruna	19AID0119	M1	No surt bé	cap	/	/
15/1/2020 vell	Jasmine de Tillet	19AID0121	M1	ok	Filla Chitra		2 HTG10, HMS2
15/1/2020 vell	Mariola	20AID0001	M1	ok	cap		
15/1/2020 vell	Mariola	20AID0001	M3	No surt bé	cap		
15/1/2020 vell	Louxor	20AID0002	M3	ok	cap		
15/1/2020 vell	Suficient	20AID0003	M3	No surt bé	cap		
4/3/2020 vell	Bruna	19AID0119	M3	ok	cap		
4/3/2020 vell	osies Brown Suga	19AID0123	M3	No surt bé	cap		3 HTG4, HMS2, HMS1
4/3/2020 vell	Samba de la Mole	19AID0129	M3	No surt bé	cap		6 VHL20, HTG4, HSM7
4/3/2020 vell	Jauchó de la Molé	19AID0133	M3	ok	pare Jasmine		
4/3/2020 vell	Khaleesi	20AID0005	M3	ok	Filla Flora		2 HMS2, HMS1
23/9/2020 vell	Suficient	20AID0003	M2	No surt bé	cap		
23/9/2020 vell	Rocky 6Q	20AID0023	M1	ok	cap		0 /
23/9/2020 vell	Rocky 6Q	20AID0023	M2	ok	cap		
23/9/2020 vell	Etoile du Plessis	20AID0030	M1	ok	cap		0 /
23/9/2020 vell	Etoile du Plessis	20AID0030	M2	ok	cap		
23/9/2020 vell	Folle Histoire	20AID0031	M1	No surt bé	cap		0 /
23/9/2020 vell	Folle Histoire	20AID0031	M2	ok	cap		
23/9/2020 vell	Gamine du Parc	20AID0032	M1	ok	cap		2 ASB2, HTG10
18/11/2020 vell	Flora	20AID0004	M1	ok	Mare Khaleesi		
18/11/2020 vell	Flora	20AID0004	M3	ok	Mare Khaleesi		
18/11/2020 vell	Finesse Van't	20AID0016	M1	ok	Mare Rabie		
18/11/2020 vell	Ravie de Cabrio	20AID0017	M1	ok	Mare Upsydaisy		
18/11/2020 vell	Upsydaisy Ter Scule	20AID0018	M1	ok	Filla Ravie i Quality Gold		
18/11/2020 vell	Quality Gold va He	20AID0019	M1	ok	Pare Upsydaisy		3 ASB23, HTG10, LEX3



8.3.2. Mostres processades amb el Kit Equine Genotypes Panel 1.1

Taula 22: Mostres processades amb el Kit Equine Genotypes Panel 1.1. Data de processat, nom, codi, matriu, resultats, relacions filials, nºal·lells perduts, al·lells perduts.

	Data de processat	Kit	Nom	codi	Matriu	Resultats	Relacions filials	nº al·lells perduts	Al·lells perduts
1	25/11/2020	nou	BRUNA	19AID0119	M1	No surt bé	cap		
2	25/11/2020	nou	BRUNA	19AID0119	M3	No surt bé	cap		
3	25/11/2020	nou	GAUCHO DE LA MC	19AID0133	M3	ok	Pare		
4	25/11/2020	nou	FLORA	20AID0004	M1	ok	Mare Khaleesi	1	VHL20
5	25/11/2020	nou	FLORA	20AID0004	M3	ok	Mare Khaleesi	5	HMS6, ASB2, HMS
6	25/11/2020	nou	KHALEESI	20AID0005	M3	ok	Filla Flora		
7	25/11/2020	nou	FINESSE VAN'T	20AID0016	M1	ok	Mare Ravie		
8	25/11/2020	nou	RAVIE DE CABRIO	20AID0017	M1	ok	Filla Finesse		
9	25/11/2020	nou	Upsydaisy Ter Scu	20AID0018	M1	ok	Filla Ravie		
10	25/11/2020	nou	Quality Gold va H	20AID0019	M1	No surt bé	Pare Upsdasy	14	tots menys 3
11	26/11/2020	nou	BRUNA	19AID0119	M1	No surt bé	cap	1	VHL20
12	26/11/2020	nou	BRUNA	19AID0119	M3	No surt bé	cap	15	VHL20, AHT4, HM
13	26/11/2020	nou	GAUCHO DE LA MC	19AID0133	M3	ok	Pare	2	HSM6, ASB2
14	26/11/2020	nou	FLORA	20AID0004	M1	ok	Mare Khaleesi	7	VHL20, HTG6, HM
15	26/11/2020	nou	FLORA	20AID0004	M3	No surt bé	Mare Khaleesi	7	VHL20, HTG6, HM
16	26/11/2020	nou	KHALEESI	20AID0005	M3	ok	Filla Flora	3	ASB2, LEX3, HMS1
17	26/11/2020	nou	FINESSE VAN'T	20AID0016	M1	ok	Mare Ravie	0	/
18	26/11/2020	nou	RAVIE DE CABRIO	20AID0017	M1	ok	Filla Finesse	6	HSM6, ASB2, HM
19	26/11/2020	nou	Upsydaisy Ter Scu	20AID0018	M1	ok	Filla Ravie	0	/
20	26/11/2020	nou	Quality Gold va H	20AID0019	M1	No surt bé	Pare Upsdasy	17	tots
21	26/11/2020	nou	Diamantina	20AID0020	M1	ok	Mare Biològica Un	2	ASB2, LEX3
22	26/11/2020	nou	Untouched Diamo	20AID0021	M1	ok	Fill Diamantina	0	/
23	26/11/2020	nou	Untouchable 27	20AID0022	M1	ok	Pare Untouched	0	/
24	26/11/2020	nou	Vleut	20AID0024	M1	ok	Semental	0	/
25	26/11/2020	nou	Vleut	20AID0024	M2	ok	Semental	0	/



Taula 23: Mostres processades amb el Kit Equine Genotypes Panel 1.1. Data de processat, nom, codi, matriu, resultats, relacions filials, nºal·lells perduts, al·lells perduts.

25	26/11/2020	nou	Vleut	20AID0024	M2	ok	Semental	0 /
26	26/11/2020	nou	Cornado	20AID0025	M1	ok	Semental	0 /
27	26/11/2020	nou	1271, receptora	20AID0035	M1	ok	Receptora Untouc	1 ASB2
28	18/12/2020	nou	Bruna	19AID0119	M1	No surt bé	cap	
29	44183	nou	Bruna	19AID0119	M3	No surt bé	cap	
30	18/12/2020	nou	Mariola	20ID00001	M1	ok	cap	
31	18/12/2020	nou	Louxor	20ID00002	M1	No surt bé, pics baixos	cap	
32	18/12/2020	nou	Suficient	20ID00003	M1	No surt bé	cap	
33	18/12/2020	nou	Tepi	20ID00006	M1	No surt bé	cap	
34	18/12/2020	nou	Tepi	20ID00006	M3	ok	cap	
35	18/12/2020	nou	Biotz	20ID00007	M1	ok	cap	
36	21/12/2020	nou	Nacira SC	20ID0010	M1	ok	cap	0 /
37	21/12/2020	nou	Maika SC	20ID0011	M1	ok	cap	1 ASB2
38	21/12/2020	nou	Piran SC	20ID0012	M1	ok	cap	0 /
39	21/12/2020	nou	Quirina SC	20ID0013	M1	ok	cap	1 ASB2
40	21/12/2020	nou	Itaca SC	20ID0014	M1	ok	Mare de Ziroco	0 /
41	21/12/2020	nou	Ziroco SC	20ID0015	M1	ok	Fill d'Itaca	0 /
42	21/12/2020	nou	ptora Guerre Dair	20ID0026	M2	ok	cap	1 AHT4
43	21/12/2020	nou	Gipsy, receptora	20ID0029	M1	ok	cap	0 /
44	21/12/2020	nou	Gipsy, receptora	20ID0029	M2	tornar a punxar	cap	1 AHT4
45	21/12/2020	nou	BRUNA	19AID0119	M1	repunxada, ok	cap	1 ASB2
46	21/12/2020	nou	BRUNA	19AID0119	M3	repunxada, ok	cap	0 /
47	21/12/2020	nou	Mariola	20ID0001	M1	repunxada, ok	cap	0 /
48	21/12/2020	nou	Louxor	20ID0002	M1	repunxada, repetir PCR	cap	5 VHL20, ASB23, AS
49	21/12/2020	nou	Suficient	20ID0003	M1	repunxada, ok	cap	2 ASB2, LEX3
50	21/12/2020	nou	Tepi	20ID0006	M1	repunxada, ok	cap	15 tots menys 2
51	21/12/2020	nou	Tepi	20ID0006	M3	repunxada, reinjectar	cap	0 /
52	21/12/2020	nou	Biotz	20ID0007	M1	repunxada, ok	cap	1 ASB2



8.4.1. Introducció de perfils STRs Equí

Taula 24: Taula d'introducció dels perfils genètics obtinguts. Mostres processades i marcadors d'èquids.

		INTRODUCCION DE PERFILES STR's EQUINO																																					
		VALIDACIÓN DE CARRERAS																																					
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18			
		PERFIL GENÉRICO STR's		VHL20		HTG4		AHT4		HSM7		HTG6		AHT5		HSM6		ASB23		ASB2		HTG10		HTG7		HMS3		HMS2		ASB17		LEX3		HMS1		CA425			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38		
1	CONTROL	J	M	M	M	J	J	L	L	O	O	J	O	K	M	I	S	K	M	O	O	K	K	P	P	R	R	N	R	M	P	J	M	M	N				
2	20AID0020-M1	M	P	M	M	J	J	O	O	G	J	J	J	P	P	J	K			M	O	K	N	I	I	L	L	F	N			I	M	N	N				
3	20AID0021-M1	M	M	K	M	J	J	L	O	G	J	J	J	M	P	K	U	N	N	M	O	N	N	I	I	H	L	N	R	M	M	M	N	N	O				
4	20AID0022-M1	I	M	K	P	J	L	J	L	J	O	J	K	M	P	U	U	N	O	O	O	N	N	I	I	H	H	N	R	M	M	J	N	I	O				
5	20AID0035-M1	L	N	K	K	I	J	J	L	J	J	J	M	L	P	I	U			I	M	K	M	P	P	K	O	N	R	H	M	J	J	J	N				
6	19AID0133-M3	M	M	L	M	H	J	J	K	J	O	O	O			L	U			K	R	O	O	N	P	P	R	M	R	F	F	J	M	N	N				
7	20AID0004-M1	R	R	K	P	J	J	N	O	J	O	K	M	L	O	J	L	R	R	O	O	R	O	O	M	R	K	R	F	O	J	L	J	M	L	N			
8	20AID0005-M3	R	R	M	P	J	J	K	O	G	J	K	O	M	O	J	S	O	O	I	R	O	O	M	R			F	N	J	M			M	O				
9	20AID0016-M1	I	O	K	L	H	H	J	L	G	J	K	N	L	P	J	U	M	N	K	M	O	O	M	Q	H	L	K	M	N	O	J	M	L	O				
10	20AID0017-M1	N	O	L	M	H	H	K	L	G	J	K	K			U	U			K	M	O	O					K	K				J	L					
11	20AID0018-M1	N	P	M	M	H	H	K	L	G	J	K	O	L	M	K	U	M	R	M	S	N	O	I	Q	L	M	K	K	L	M	J	M	J	O				
12	20AID0023-M1	N	P	M	M	H	J	N	O	O	O	J	P	K	P	J	K	N	N	M	O	K	N	I	P	L	L	R	R	K	K	I	M	L	N				
13	20AID0024-M1	I	M	K	M	J	K	L	N	G	J	J	N	K	P	I	K	K	R	K	O	K	N	O	P	M	R	N	R	K	K	M	N	N					
14	20AID0025-M1	O	R	K	N	H	J	K	N	G	J	K	M	P	P	K	U	N	R	M	O	O	O	I	P	K	K	M	N	L	L	M	M	J	N				
15	20AID0010-M1	I	M	K	M	J	O	L	M	O	O	J	N	L	P	L	U	K	K	I	L	K	N	O	P	H	K	M	N	M	P	J	I	N	N				
16	20AID0011-M1	M	M	K	K	O	O	L	O	J	J	M	M	L	M	K	L			M	M	N	O	O	P	M	R	M	R	K	M	M	M	N	N				
17	20AID0012-M1	M	M	L	M	O	O	M	O	O	O	J	M	L	M	K	K	K	K	N	R	O	O	O	P	H	L	K	R	F	F	J	M	J	N				
18	20AID0013-M1	M	R	K	K	O	O	L	O	G	J	K	M	M	P	L	U			N	O	O	O	I	O	K	M	M	N	M	M	M	N	N					
19	20AID0014-M1	I	L	K	M	O	O	L	O	G	O	K	M	M	P	L	U	K	Q	M	R	N	N	I	M	H	K	N	R	M	O	J	M	N	N				
20	20AID0015-M1	I	P	M	M	H	O	L	L	O	O	K	K	P	P	U	U	K	M	M	O	N	O	I	P	H	M	M	N	O	O	I	J	N	O				
21	20AID0026-M2	M	M	K	M			O	O	J	O	I	J	M	M	K	U	Q	Q	I	I	M	O	N	N	L	O	O	R	N	N	M	M	M	N				
22	20AID0029-M2	I	L	L	L			N	N	J	J	K	K	M	M	I	J	P	P	I	I	O	O	I	P	K	O	R	H	K	J	J	M	N					
23	19AID0119-M3	Q	Q	M	N	H	K	M	N	J	O	K	K	L	O	J	S	M	N	M	O	O	O	P	P	K	K	H	R	F	N	J	M	G	N				
24	20AID0001-M1	I	M	M	M	O	O	J	M	I	J	J	O	M	O	I	J	K	O	N	P	O	O	I	N	H	K	J	R	L	O	M	M	L	N				
25	20AID0002-M1			K	L	H	H	K	L	G	G	N	N	K	K							I	R	M	O	M	N	H	R				I	J	N	M			
26	20AID0003-M1	I	L	K	M	O	O	L	O	G	O	K	K	M	O	L	U			M	R	N	N	I	M	H	K	N	R			J	M	N	M				
27	20AID0006-M3	O	Q	M	N	J	P	N	O	J	O	M	N	P	P	L	L	M	Q	K	O	O	O	I	P	H	R	M	N	K	K	I	J	N	M				
28	20AID0007-M1	P	R	K	M	J	P	K	N	G	J	K	N	O	P	J	S			K	K	O	O	I	O	K	K	O	R	P	P	J	M	N	M				
29	20AID0121-M1	I	R	K	M	J	J	J	K	J	J	J	O	M	P	I	K	R	R			K	O	P	P			O	S	F	I	J	M	O	F				
30	20AID0123-M3	N	N			H	J	J	J	J	O	J	K	L	P	K	K	R	R	K	R	O	O	P	P			N	W	H	I			M	O				
31	19AID0129-M3					H	J			M	Q	O	O	L	Q	G	I			K	L	O	O	N	P			N	R	H	I			O	O				
32	20AID0030-M1	O	R	K	L	K	P	N	N	G	J	J	K	L	P	K	L	M	O	I	I	M	N	N	P	M	O	R	S	H	P	J	J	N	M				
33	20AID0031-M2	M	N	L	M	J	O	L	M	O	O	J	K	P	P	K	S	R	R	I	I	K	O	P	R	M	P	N	N	H	M	J	J	J	M				
34	20AID0032-M1	L	M	K	L	O	O	M	N	G	G	K	K	L	M	I	U					K	O	M	N	K	K	N	R	H	H	J	M	L	L				
35	20AID0019-M1	M	P	M	M	H	O	J	L	G	O	K	K	L	O	I	K					N	O	I	P	M	M	K	R			I	J	N	O				



8.4.2. Full de relacions de parentesc

Taula 25: Plantilla d'excel "EQUINS" on es mira la compatibilitat de les relacions filials dels individus introduïts al program

PERFIL BUSCADO																							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
VHL20	HTG4	AHT4	HSM7	HTG6	AHT5	HSM6	ASB23	ASB2	HTG10	HTG7	HMS3	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425							
20AID0021-M1																							
M	M	K	M	J	J	L	O	G	J	J	J	M	P	K	U	N	N	M	O	N	N	I	I
20AID0022-M1 COTEJO 2-2																							
I	M	K	P	J	L	J	L	J	O	J	K	M	P	U	U	N	O	O	O	N	N	I	I
PERFIL ENCONTRADO																							
\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	\$N/A	
RESULTADOS DEL COTEJO CON LA BASE DE DATOS																							
Coincidencia 100%																							
1																							
1 20AID0021-M1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
Selecciona con una "X" para virtualizar el cotejo del perfil																							
Coincidencia 50%																							
2																							
1 20AID0020-M1																							
2 20AID0022-M1																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
Coincidencia 50%-1																							
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
Coincidencia 50%-2																							
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
Coincidencia 50%-3																							
2																							
1 20AID0023-M1																							
2 20AID0003-M1																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
Coincidencia 50%-4																							
4																							
1 20AID0024-M1																							
2 20AID0011-M1																							
3 20AID0013-M1																							
4 20AID0014-M1																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
Coincidencia 50%-5																							
5																							
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							